



Universidad Autónoma
de Madrid

Facultad de Ciencias

Doctorado en Microbiología

Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* en un hospital de tercer nivel: retos y mejoras

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Isabel Fradejas Villajos

Licenciada en Farmacia

Bajo la dirección de:

Dra. Ana Pérez de Ayala Balzola

Dr. José Miguel Rubio Muñoz

Realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre



Hospital Universitario
12 de Octubre



La Doctora **Ana Pérez de Ayala Balzola**, Facultativa Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre e investigadora principal del grupo de Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes de la Fundación de Investigación Biomédica i+12,

CERTIFICA QUE:

Isabel Fradejas Villajos ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor, titulado:

Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* en un hospital de tercer nivel: retos y mejoras

Y para que así conste, firman la presente certificación en Madrid, 2019

Fdo.: Dra. Ana Pérez de Ayala Balzola

El Doctor **José Miguel Rubio Muñoz**, científico titular del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) y director del Laboratorio de Malaria y otras parasitosis emergentes,

CERTIFICA QUE:

Isabel Fradejas Villajos ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor, titulado:

**Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* en un hospital de
tercer nivel: retos y mejoras**

Y para que así conste, firman la presente certificación en Madrid, 2019

Fdo.: Dr. José Miguel Rubio Muñoz

Resumen

La estrongiloidiasis, infección causada por el nematodo intestinal *Strongyloides stercoralis*, sigue siendo una gran desconocida tanto en áreas endémicas como en nuestro medio, debido a que la mayoría de los casos son asintomáticos y a las propias limitaciones en el diagnóstico de laboratorio. A pesar de tratarse de una enfermedad tropical, el aumento del número de viajeros y de los movimientos poblacionales, asociados a la inmigración y a los refugiados, ha hecho que cada vez sean más comunes los casos importados.

El *screening* y tratamiento de los pacientes con infección por *S. stercoralis* es indispensable debido a la posibilidad de desarrollar cuadros graves en caso de inmunosupresión. Por ello, el objetivo de este estudio fue conocer la situación de la infección en el Hospital Universitario 12 de Octubre, tanto desde el punto de vista clínico-epidemiológico como desde la perspectiva del laboratorio de Microbiología. De esta forma, se evaluaron las carencias y posibles mejoras en el diagnóstico parasitológico y serológico, así como la introducción de técnicas moleculares en la rutina asistencial.

Se detectó un importante número de casos de estrongiloidiasis importada, principalmente en pacientes inmigrantes latinoamericanos. Algo menos de la mitad de los casos tuvo síntomas atribuibles a la estrongiloidiasis, siendo la eosinofilia la principal alteración analítica. La detección de larvas en heces se asoció a la clínica gastrointestinal, a la presencia de comorbilidades y a la eosinofilia. Los factores asociados a la inmunosupresión fueron el género masculino y la ausencia de síntomas y de eosinofilia. Los índices de la serología de *S. stercoralis* fueron mayores en pacientes con detección de larvas en heces y menores en pacientes inmunosuprimidos. El seguimiento de los casos fue muy heterogéneo, normalizándose los niveles de eosinófilos y los índices serológicos antes de los 6 meses post-diagnóstico en la mayoría de los pacientes tratados. Tras la implantación de la RT-PCR en heces, las recomendaciones sobre la recogida/conservación de las muestras y el cambio en el método de lavado de la técnica serológica, la proporción de casos con detección de larvas en heces aumentó hasta seis veces con respecto al inicio del estudio. La técnica serológica basada en antígeno recombinante no fue lo suficientemente sensible como para sustituir a la realizada de rutina, basada en antígeno crudo. En cuanto al cultivo en placa de agar, su rendimiento fue tres veces mayor que el de la visualización directa de las heces tras la concentración con el método formalina-éter, aunque el tiempo de incubación del cultivo no debería reducirse a menos de una semana.

En conclusión, se describe una importante cohorte de pacientes con infección por *S. stercoralis*, así como una mejora en el diagnóstico de laboratorio. Es necesaria la aplicación de protocolos tanto de *screening* del inmigrante asintomático como de seguimiento de los casos de estrongiloidiasis.

Abstract

Strongyloidiasis, caused by the intestinal nematode *Strongyloides stercoralis*, remains an underdiagnosed infection both in endemic and in non-endemic countries because most of the cases are asymptomatic and due to the limitations in laboratory diagnosis. Although it is a tropical disease, imported cases have become more and more common, due to the increasing number of travellers, as well as population movements associated with immigration and refugees.

The screening and treatment of patients with *S. stercoralis* infection is essential because of the potential of developing severe symptoms in immunosuppressed patients. Therefore, the aim of this study was to know the situation of the infection in the Hospital Universitario 12 de Octubre, both from the clinical-epidemiological point of view and from the perspective of the Microbiology laboratory. In this way, the limitations and possible improvements in parasitological and serological diagnosis were evaluated, as well as the introduction of molecular techniques in the routine laboratory testing.

A significant number of cases of imported strongyloidiasis were detected, mainly in immigrant Latin American patients. Less than half of the patients had symptoms related to *S. stercoralis*, being the eosinophilia the main analytical alteration. The detection of larvae in faeces was associated to gastrointestinal symptoms, comorbidities and eosinophilia. Immunosuppression was associated with being male, the absence of symptoms and the absence of eosinophilia. Serological indexes were higher in those with larvae detection in stool and lower in immunosuppressed patients. Patient follow-up was very heterogeneous. In most of the treated patients, eosinophil levels and serological indexes decreased within the 6 months post-diagnosis. After the implementation of the faecal RT-PCR, as well as the recommendations regarding the collection and conservation of stool samples and the change in the washing method of the serological technique, the proportion of cases with detection of larvae in stool increased up to six times compared to the beginning of the study. The serological technique based on recombinant antigen was not sensitive enough to replace the one based on crude antigen; which is the routine technique used in our laboratory. The detection rate of agar-plate culture was three times higher than the detection rate of direct visualization of the stool after formalin-ether concentration, although the incubation of the agar-plate culture should not be less than one week.

In conclusion, in this study, an important cohort of patients with *S. stercoralis* infection is described, as well as an improvement in the laboratory diagnosis. There is an urgent need to apply screening protocols in asymptomatic immigrants and monitoring cases of strongyloidiasis.

Agradecimientos

A Ana, por guiarme en esta dura aventura parasitológica. Aunque aún no he terminado el camino, ya parece que veo la luz al final del túnel. Esperemos que la aventura continúe.

A José Miguel, por ayudarnos tanto en lo molecular como en lo personal.

A Esperanza y José María, por su disposición y colaboración en este trabajo.

A todo el staff del Servicio de Microbiología, por haberme dado la oportunidad de continuar mi vida de microbióloga más allá de la residencia.

Por supuesto, a todo el equipo técnico del laboratorio, porque sin vosotras se hundiría el Servicio. En especial tengo mucho que agradecer a las currantas de la sección de Parasitología. A las que me enseñaron todo desde el principio: Ana Cueli y M^a José Babiano, muchas gracias por aguantar a esa R2 motivada que se quedaba horas mirando concentrados negativos. Y a las que, a día de hoy, me siguen ayudando, enseñando y sobre todo asombrando con su buen ojo al microscopio: Juani y Manoli. Ha sido y es un placer trabajar con vosotras. Ya sabéis que sin vuestro trabajo no podría haber escrito nada sobre cultivos positivos, lavados “enérgicos” de serologías y larvas de cola bifurcada. Al equipo fúngico y ex-fúngico: Rosaura, Rosa y Mamen por darme ánimos e insistir siempre en que me lo crea más.

A Juan, Manolo y David Lora por los asesoramientos clínicos y estadísticos de emergencia.

A mi Irenu, porque has sido mi mayor apoyo en esos días de nube gris -tirando a negra- en la 7 y como siempre me repites...todo esto servirá de algo. A Paula e Inés por animarme con esos cánticos cada vez que pasáis por la puerta del demonio que se atasca. A los resis (y no tan resis) Raúl, Alhena, Angelines, Octavio, Mario, Mamen y Gongo, gracias por soportar mi cara mustia en los desayunos, espero ser algo menos *hater* de ahora en adelante. Y a los que fueron mis Rs mayores: Lourdes, Maricruz y Andrés, por ser los mejores compañeros del metal en los duros comienzos de mi andadura microbiológica.

Por supuesto, gracias a mis amigos de siempre: María, Mota (lo morado es Gram positivo), Carlos y Miguel. Después de tesis, másters, oposiciones y juicios nos merecemos una quedada en condiciones para hablar de lo mayores que “semos”.

A Coral, Binla, Roci (he estado más “far from the shallow” que nunca en este último mes), Silvia, Édgar, Diego y Adri, gracias porque sin saberlo habéis hecho que mi meta sea acabar la tesis antes del 21 de junio a las 2 y media, ¿qué duda cabe?

A mis compañeros y amigos de Análisis y Bioquímica, por recibirme y tratarme como una infiltrada más desde el principio de mi errequeatritis allá por mayo de 2013.

Gracias a mis padres, porque sé que confiáis en mí (...y que solo queréis desearme suerte y contáis conmigo...) más de lo que yo confío. Se acabaron los ladridos en respuesta a los “¿qué tal?”, por lo menos por un tiempo.

Y por último, a Fabián, por ser mi maquetador favorito, porque te voy a tener que pagar para que no me dejes después de esta etapa y porque siempre has estado ahí. Gracias.

Índice

Índice de tablas.....	3
Índice de figuras	5
Glosario de abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	9
1.1. Estrongiloidiasis, una enfermedad olvidada entre las olvidadas	9
1.2. Historia	10
1.3. Epidemiología.....	10
1.4. El parásito	12
1.5. Ciclo biológico	13
1.6. Vías de transmisión y reservorios.....	15
1.7. Cuadros clínicos.....	16
1.8. Diagnóstico de laboratorio	18
1.9. Tratamiento de la estrongiloidiasis	25
1.10. Seguimiento de los pacientes tras el tratamiento específico	26
1.11. Otros aspectos de la infección por <i>S. stercoralis</i>	27
2. Justificación.....	31
3. Objetivos	33
4. Material y métodos	35
4.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características clínico-epidemiológicas de los pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre en un periodo de 5 años.....	37
4.2. Análisis de la evolución clínico-analítica de pacientes con estrongiloidiasis tratada en el Hospital Universitario 12 de Octubre.....	49
4.3. Análisis de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de <i>S. stercoralis</i> utilizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre	53
5. Aspectos éticos y confidencialidad	63

6. Resultados	65
6.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características clínico-epidemiológicas de los pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre en un periodo de 5 años.....	65
6.2. Análisis de la evolución de pacientes con estrongiloidiasis tratada en el Hospital Universitario 12 de Octubre	77
6.3. Análisis de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de <i>S. stercoralis</i> utilizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre	87
7. Discusión.....	97
7.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características sociodemográficas de la población atendida	97
7.2. Síntomas relacionados con la infección por <i>S. stercoralis</i>	101
7.3. Seguimiento de los pacientes.....	104
7.4. Técnicas diagnósticas de laboratorio.....	105
8. Conclusiones.....	111
9. Limitaciones	113
10. Bibliografía	115
Anexo 1. Material suplementario.....	133
Anexo 2. Producción científica.....	149
A2.1. Comunicaciones presentadas en congresos	149
A2.2. Artículos publicados	157

Índice de tablas

Tabla 1. Características morfológicas de los distintos estadios de <i>Strongyloides stercoralis</i> .	13
Tabla 2. Población empadronada general y población empadronada inmigrante de área endémica (Latinoamérica, África, Asia y Oceanía) en el área atendida por el Hospital Universitario 12 de Octubre en el periodo de estudio.	38
Tabla 3. Número de casos y tasa de incidencia de estrongiloidiasis (nº de casos/100.000 habitantes) por año de estudio.	68
Tabla 4. Características sociodemográficas de los 276 pacientes incluidos en el estudio.	72
Tabla 5. Inmunosupresión y comorbilidades de los 276 casos de estrongiloidiasis.	73
Tabla 6. Otras enfermedades infecciosas.	74
Tabla 7. Características clínicas.	75
Tabla 8. Tratamiento específico frente a la estrongiloidiasis.	76
Tabla 9. Resultados analíticos.	76
Tabla 10. Resultados de las técnicas diagnósticas.	76
Tabla 11. Distribución de pacientes según los distintos criterios de cura.	83
Tabla 12. Resumen de los pacientes con fracaso de tratamiento según al menos un criterio (N=10).	86
Tabla 13. Distribución de casos de estrongiloidiasis confirmados y no confirmados por año (N=258).	89
Tabla 14. Análisis comparativo de las técnicas diagnósticas parasitológicas y la proporción de casos confirmados en los periodos de estudio A y B.	91
Tabla 15. Distribución de las muestras (diagnósticas y de seguimiento) según concordancia (N=249).	92
Tabla 16. Clasificación de los resultados (muestras diagnósticas) según los gold-estándar primario y compuesto (N=223).	94

Tabla 17. Sensibilidad, especificidad e índice Kappa de las dos técnicas comerciales evaluadas según los gold-estándar primario y compuesto (N=223).	94
Tabla 18. Distribución de pacientes (N=75) y muestras (N=141) según TTP.	96
Tabla 19. N° de casos confirmados y tasas de incidencia (n° casos confirmados/100.000 habitantes) por año de estudio.....	134
Tabla 20. Características demográficas, clínicas y analíticas de los 38 pacientes sin factores de riesgo con serología positiva de <i>S. stercoralis</i>	135
Tabla 21. Países de origen de los pacientes incluidos en el estudio (N=276).	137
Tabla 22. Número de muestras de heces recibidas por paciente y técnicas diagnósticas positivas.....	138
Tabla 23. Análisis univariante y multivariante: casos confirmados vs. casos no confirmados.....	139
Tabla 24. Análisis univariante y multivariante: inmunosuprimidos vs. inmunocompetentes.....	140
Tabla 25. Análisis univariante y multivariante: casos sintomáticos vs. casos asintomáticos.....	141
Tabla 26. Características sociodemográficas de los casos de estrongiloidiasis tratados y con seguimiento (N=59).	142
Tabla 27. Tasas de detección por paciente y año de las técnicas diagnósticas de <i>S. stercoralis</i> en pacientes con serología positiva (N=258).	143
Tabla 28. Tasas de detección por muestra y año de las técnicas diagnósticas de <i>S. stercoralis</i> en pacientes con serología positiva (N=258).	143
Tabla 29. Sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas evaluadas en función de distintos puntos de corte hipotéticos.	144
Tabla 30. Valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) en función de distintos niveles de prevalencia.	144
Tabla 31. Descriptivos de los pacientes con APC positivo y análisis univariante en función del TTP medio <3.	147

Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia de <i>S. stercoralis</i> según área geográfica.....	12
Figura 2. Ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	15
Figura 3. <i>Larva currens</i> en área perianal, muslo y espalda.	18
Figura 4. Técnica de Baermann (A) y método de Harada-Mori (B).....	21
Figura 5. Cultivo en placa de agar positivo.	21
Figura 6. Larvas rabditiforme (izquierda) y filariforme (centro y derecha) de <i>S. stercoralis</i> observadas en cultivo en placa de agar.	22
Figura 7. Diferenciación de las larvas de <i>Strongyloides</i> spp. y uncinarias.....	22
Figura 8. Secuencia consenso amplificada por la RT-PCR.	41
Figura 9. Clasificación de casos en pacientes con serología positiva.	42
Figura 10. Clasificación de casos en pacientes con serología negativa o no realizada.	43
Figura 11. Algoritmo diagnóstico de la estrongiloidiasis antes de la introducción de la RT-PCR en heces (junio 2013-junio 2015).....	54
Figura 12. Algoritmo diagnóstico de la estrongiloidiasis después de la introducción de la RT-PCR en heces (junio 2015-octubre 2018).....	55
Figura 13. Resumen del plan de investigación del estudio.....	61
Figura 14. Clasificación de pacientes con serología de <i>S. stercoralis</i> positiva (N=305).	66
Figura 15. Clasificación de pacientes con serología de <i>S. stercoralis</i> negativa o no realizada (N=9).	66
Figura 16. Distribución de pacientes con alguna prueba diagnóstica específica de <i>S. stercoralis</i> positiva.	67
Figura 17. Distribución temporal de la cohorte principal del estudio: número de casos totales y tasas de incidencia anual calculadas con casos totales y con casos confirmados.	68

Figura 18. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo de seguimiento de estrongiloidiasis (N=59).	77
Figura 19. Evolución serológica (A) y analítica (B) de los pacientes con estrongiloidiasis tratada (N=58).	80
Figura 20. Comparación de los índices serológicos al diagnóstico y antes (A) o después (B) de 6 meses post-diagnóstico.....	81
Figura 21. Comparación de los niveles de eosinófilos al diagnóstico y antes (A) o después (B) de 6 meses post-diagnóstico.	82
Figura 22. Evolución del índice de la serología de los 5 pacientes considerados fracaso serológico.	84
Figura 23. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el análisis de técnicas diagnósticas (N=258).....	87
Figura 24. Distribución de casos de estrongiloidiasis confirmados y no confirmados por año (N=258).....	89
Figura 25. Índice serológicos en función de la técnica de confirmación diagnóstica. ...	90
Figura 26. Clasificación de las muestras según los gold-estándar predefinidos.	93
Figura 27. Distribución de muestras de heces en función del TTP (N=141).	96
Figura 28. Protocolo de screening y seguimiento de pacientes atendidos en la consulta de Medicina Interna/Infecciosas.....	133
Figura 29. Número de casos indeterminados por año de diagnóstico.	136
Figura 30. CrAg-ELISA (Gold-estándar primario); AUC=0,920.....	145
Figura 31. CrAg-ELISA (Gold-estándar compuesto); AUC=0,903.	145
Figura 32. NIE-ELISA (Gold-estándar primario); AUC=0,897.....	146
Figura 33. NIE-ELISA (Gold-estándar compuesto); AUC=0,923.	146

Glosario de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	<i>Agar Plate Culture</i> (Cultivo en placa de agar)
ARN	Ácido Ribonucleico
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área bajo la curva)
CO	<i>Cut-Off</i> (Punto de corte)
CrAg	<i>Crude Antigen</i> (Antígeno crudo)
DO	Densidad Óptica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
HAI	Hemaglutinación Indirecta
HTLV-1	<i>Human T-Lymphotropic Virus 1</i> (Virus linfótropo T humano 1)
IC95%	Intervalo de Confianza del 95%
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G1
IgG4	Inmunoglobulina G4
IQR	<i>Interquartile Range</i> (Rango intercuartílico)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espacio intergénico)
L1-L4	Larva 1-4
LAMP	<i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i> (Amplificación isotérmica mediada por "loop")

Abreviatura	Significado
NIE	Antígeno recombinante de <i>Strongyloides</i>
NTD	<i>Neglected Tropical Disease</i> (Enfermedad tropical desatendida)
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica operativa del receptor)
RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i> (PCR a tiempo real)
S	<i>Signal</i> (Señal)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación estándar)
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SIL	Sistema Interno del Laboratorio
STH	<i>Soil Transmitted Helminth</i> (Helminto transmitido por contacto con el suelo)
TTP	<i>Time To Positivity</i> (Tiempo de positivización)
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

1. Introducción

En los últimos años, fenómenos como la inmigración y el auge de los viajes internacionales a áreas tropicales han hecho que los profesionales de la salud nos enfrentemos al reto diagnóstico de enfermedades infecciosas poco comunes en nuestro medio. Por ello, es importante conocer estas infecciones tropicales desde todos los puntos de vista: su epidemiología, su clínica, los métodos diagnósticos más adecuados, así como el manejo y seguimiento de los pacientes. En este aspecto, la estrongiloidiasis es una de las enfermedades más desconocidas, ya que en la mayoría de los casos causa infecciones crónicas asintomáticas y no se suele realizar una búsqueda activa. Además, algunos de los métodos diagnósticos de laboratorio son desconocidos para los clínicos y en otros casos, aunque se soliciten las pruebas adecuadas, su escasa sensibilidad limita el adecuado cribado de la infección.

1.1. Estrongiloidiasis, una enfermedad olvidada entre las olvidadas

Strongyloides stercoralis, agente causal de la estrongiloidiasis, es un helminto intestinal transmitido por el contacto con el suelo (*soil-transmitted helminth*, STH), al igual que otros parásitos como *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*. En el humano, la infección por estos helmintos se produce, bien por ingestión de huevos presentes en la comida o utensilios contaminados, en el caso de *Ascaris* y *Trichuris*, o bien por la penetración cutánea de larvas, en el caso de *Ancylostoma*, *Necator* y *Strongyloides* (1). A diferencia de estos parásitos, *S. stercoralis* no se encuentra incluido dentro del grupo de Enfermedades Tropicales Olvidadas (*Neglected Tropical Diseases*, NTD) (2). Se estima que entre 30 y 100 millones de personas están infectadas a nivel mundial (1), aunque debido a sus dificultades diagnósticas y a la baja sospecha clínica, probablemente esta cifra sea mucho mayor, llegando a los 370 millones de pacientes, tal y como estiman algunos autores (3). A pesar de la gravedad de los cuadros que puede producir en inmunodeprimidos, este parásito es raramente reconocido como un problema de Salud Pública, debido principalmente a los problemas con su diagnóstico. Por tanto, en comparación con los ya citados helmintos intestinales de ciclo similar, la información

acerca de la epidemiología de la estrongiloidiasis, así como las medidas de control y protocolos diagnósticos son mucho más limitados.

1.2. Historia

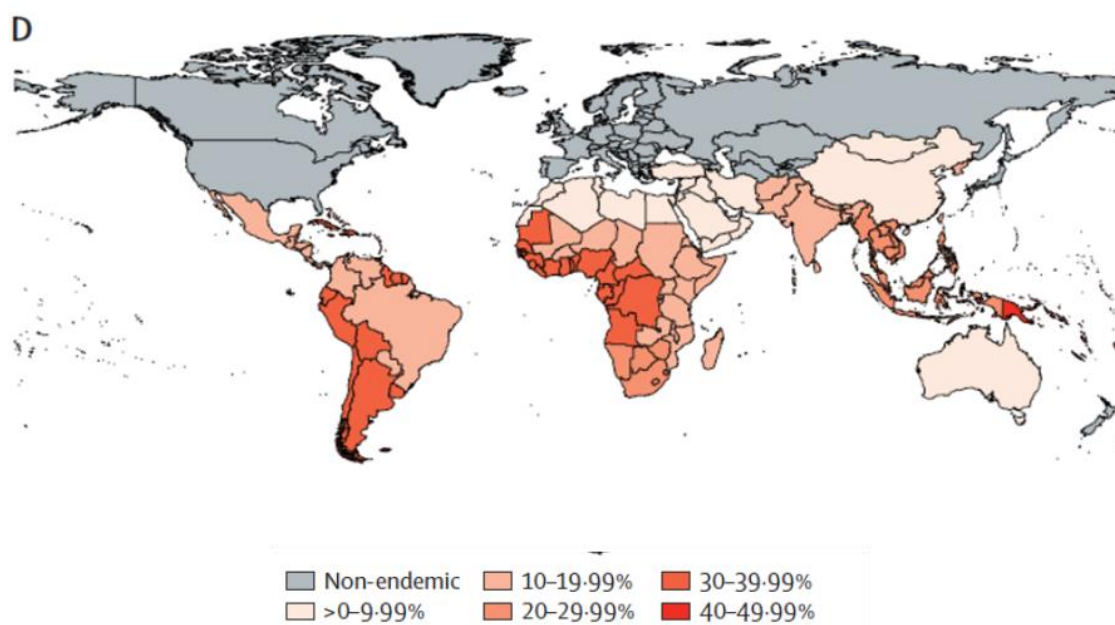
Strongyloides stercoralis fue descrito por primera vez por el cirujano naval francés Louis Normand en 1876. Este cirujano identificó las larvas de este nematodo en las heces de soldados con diarrea grave procedentes de la zona meridional de Vietnam, también denominada Cochín-China (en francés *Cochinchine*). Por ello, a la diarrea producida por *Strongyloides* se le denomina coloquialmente “diarrea de la Conchinchina” (4). Normand, no solo logró identificar las larvas de este parásito en las heces de los veteranos, sino que también consiguió aislar la larva filariforme tras el cultivo *in vitro* de las muestras, así como localizar al parásito en otros órganos del cuerpo mediante autopsia.

1.3. Epidemiología

La infección por *S. stercoralis*, es endémica en áreas con clima tropical húmedo, incluyendo Latinoamérica, África, Asia y algunas zonas de Oceanía (5,6) (Figura 1). Es difícil definir con exactitud la prevalencia de la infección a nivel global, ya que no se han realizado estudios en todas las áreas tropicales, siendo especialmente escasos en el centro y sur del continente africano, y los estudios que hay varían mucho en cuanto a su diseño, las técnicas diagnósticas usadas y el tipo de población. El principal factor limitante en este aspecto es la falta de sensibilidad de las técnicas diagnósticas, algo que se desarrollará más adelante. Además, muchos de los estudios de prevalencia no se centran exclusivamente en *S. stercoralis*, sino que estudian conjuntamente otros parásitos intestinales, utilizando principalmente la visualización directa de las heces como técnica diagnóstica, la cual tiene una sensibilidad muy limitada para la detección de *S. stercoralis* (7). En el meta-análisis más reciente sobre estudios de prevalencia de *Strongyloides* a nivel mundial, Schar et al. concluye que la prevalencia en áreas tropicales y subtropicales se encuentra entre el 10 y el 40%, y que podría llegar hasta el 60% en países de menor nivel socio-económico (5). Los países con mayor número de estudios realizados y, por tanto, de los que se dispone de una información más completa acerca de la prevalencia, son Brasil y Tailandia. En Brasil, los estudios comunitarios estiman cifras en torno al 13%, mientras que en Tailandia esta cifra es

mucho mayor, llegando a estar infectada hasta un tercio de la población. Por otra parte, los estudios de prevalencia en áreas sobrepobladas como China e India, así como en áreas de África Subsahariana, son escasos y probablemente esta infección esté infradiagnosticada (5).

En cuanto a la epidemiología en Europa, la estrongiloidiasis es considerada una enfermedad parasitaria profesional en individuos que han trabajado en arrozales (8) o minas de carbón (9). Los estudios epidemiológicos se centran principalmente en inmigrantes y refugiados procedentes de áreas endémicas (10–12), siendo la mayoría de los casos diagnosticados en Europa estrongiloidiasis importadas. En nuestro país, la infección intestinal por *S. stercoralis* es la cuarta enfermedad importada más frecuente en inmigrantes (13). A pesar de que algunos autores han considerado España como área endémica (5,14), los estudios de prevalencia en los que se apoyan estos autores están restringidos a un área muy concreta del país y a una población con unos factores de riesgo determinados (8,15,16). Estos estudios determinaron que en la zona de La Safor (Comunidad Valenciana) la tasa de infección por *Strongyloides* oscilaba entre el 0,9% y el 12,4%. Hay que destacar que la población incluida en el estudio que describe la prevalencia del 12,4% (8) estaba compuesta exclusivamente por trabajadores de los arrozales, algo que ya se determinó como factor de riesgo en un estudio prospectivo hospitalario previo realizado en el mismo área geográfica (15). En este estudio, la mayoría de los pacientes diagnosticados de estrongiloidiasis eran hombres de edad avanzada que referían haber trabajado en arrozales en su juventud. En el resto de estudios realizados en otras zonas de nuestro país, la mayor parte de los casos de estrongiloidiasis etiquetados como autóctonos han sido diagnosticados solo por serología (11,17), algo que puede dar lugar a confusión ya que no son infrecuentes las reactividades cruzadas de las técnicas serológicas. Por tanto, aunque sí que se han documentado casos endémicos en áreas de España diferentes a la ya citada costa Mediterránea, estos casos son esporádicos y son principalmente diagnosticados en pacientes de edad avanzada (18). Esto podría explicarse porque se infectaran en la juventud por contacto con el parásito en zonas de nuestro país en las que hubo transmisión en algún momento, pero no implica necesariamente que haya una transmisión estable del parásito en la actualidad ni que se deba considerar España como área endémica en su conjunto (19).



[Adaptado de The Lancet 2018 (6)]

Figura 1. Prevalencia de *S. stercoralis* según área geográfica.

1.4. El parásito

Strongyloides stercoralis pertenece al género *Strongyloides* (Clase *Secernentea*, orden *Rhabditida*, superfamilia *Rhabditoidea*, familia *Strongyloididae*) (20). Este género está compuesto por al menos 50 especies de parásitos obligados de vertebrados, cuya principal particularidad es que presentan un ciclo biológico de vida libre y otro ciclo parásito (21).

Las dos especies que infectan al hombre son *S. stercoralis* y *S. fuelleborni*. El primero es de distribución cosmopolita e infecta exclusivamente a humanos, mientras que de *S. fuelleborni* se conocen dos especies: *S. fuelleborni fuelleborni*, limitado a algunas zonas de África Occidental y Sudeste Asiático y cuyo principal hospedador son los primates, y *S. fuelleborni kelleyi*, identificado solo en Papúa Nueva Guinea y del que no se conocen reservorios animales (22). La morfología de *Strongyloides* varía según el estadio en el que se encuentre el parásito. De esta forma, se pueden distinguir las fases que se muestran en la Tabla 1.

Los huevos son ovalados y miden entre 30 x 50 μm y 34 x 58 μm . Son parcialmente embrionados y son liberadas en la mucosa intestinal en el caso de las hembras parásitas y en el suelo por las hembras de vida libre.

En cuanto a la morfología de *S. fuelleborni*, tanto los huevos como las formas adultas son muy similares a *S. stercoralis* y por tanto son prácticamente indistinguibles por sus características microscópicas.

Es importante la diferenciación microscópica de las larvas de *S. stercoralis* y uncinarias, ya que comparten áreas de endemidad (23,24) y el manejo de los pacientes, así como las implicaciones clínicas, son diferentes.

Tabla 1. Características morfológicas de los distintos estadios de *Strongyloides stercoralis*.

Estadio	Hembra adulta de vida libre	Macho adulto de vida libre	Hembra adulta parásita	Larva rabditiforme	Larva filariforme
Tamaño (µm)	85 x 1000	85 x 1000	30-40 x 2100	15 x 180-240	15 x 600
Tipo de esófago	Rabditiforme	Rabditiforme	Filariforme	Rabditiforme - Ocupa un tercio del cuerpo	Filariforme - Ocupa el 40% del cuerpo
Cola	Acabada en punta	Acabada en punta y curvada ventralmente	Acabada en punta	Acabada en punta	Bifurcada
Otras características	Vulva en la mitad del cuerpo	Dos espículas simples y gubernáculo en zona terminal	Producción de huevos por partenogénesis	Primordio genital prominente	Las responsables de autoinfección son < 500 µm
Localización	Suelo contaminado con heces	Suelo contaminado con heces	Submucosa del intestino delgado	Vida libre: suelo contaminado con heces / Parásitas: tracto gastrointestinal → heces	Heces → piel → pulmón → tracto gastrointestinal

(Adaptado de *Advances in Parasitology* 2015 (25))

1.5. Ciclo biológico

El ciclo vital de *Strongyloides* es muy peculiar en comparación con otros nematodos, ya que puede sobrevivir en el mismo hospedador durante décadas gracias a los ciclos de autoinfección, mientras que en el caso de otros helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* o las uncinarias, la permanencia del parásito en el hospedador se limita al ciclo vital del parásito adulto (26). *Strongyloides stercoralis* presenta ciclo de vida libre, ciclo parásito y ciclo de autoinfección (Figura 2):

- Ciclo de vida libre: la larva rabditiforme es expulsada en las heces del hospedador definitivo y tras 4 mudas (L1→L4) se transforma en adulto de vida libre. Los adultos se aparean y producen huevos de los que salen las larvas

rabditiformes. Eventualmente se transforman en larvas filariformes (L3), que son la forma infectiva del parásito. Estas penetran percutáneamente en el hospedador definitivo y comienza el ciclo de vida parásita.

- Ciclo de vida parásita: la larva filariforme migra hacia el pulmón a través del sistema circulatorio, es expulsada a través de la tráquea, llega a la laringe y es deglutida, alcanzando finalmente el tracto gastrointestinal. Es en el intestino delgado donde la larva filariforme sufre dos mudas y se convierte en hembra adulta parásita, la cual queda anclada en la mucosa intestinal. La hembra produce huevos por partenogénesis, los libera en la mucosa intestinal y estos eclosionan rápidamente, liberando larvas rabditiformes al lumen intestinal. Estas larvas rabditiformes se expulsan con las heces y pueden seguir un ciclo de vida libre, continuar con el ciclo de vida parásita infectando a otro hospedador o, si se transforman en filariformes antes de salir con las heces, producir ciclos de autoinfección en el mismo hospedador.
- Ciclo de autoinfección: las larvas rabditiformes se transforman en filariformes en el interior del tracto gastrointestinal o en los márgenes anales, pudiendo penetrar mediante autoinfección interna o externa. De esta manera comenzaría otro ciclo parásito sin necesidad de llegar al exterior y pudiendo persistir en el organismo durante años.



Algunos autores postulan la existencia de rutas alternativas de transmisión, ya que

la que se transmiten la mayoría de los parásitos intestinales podría estar implicada en el contagio de *S. stercoralis*.

En los últimos años, la transmisión por donación de órganos ha cobrado especial importancia ya que, como consecuencia de la inmunosupresión propia del trasplante, los receptores suelen desarrollar cuadros de hiperinfección e infección diseminada. Se han descrito numerosos casos tanto en áreas endémicas como no endémicas (debido a donantes procedentes de área endémica) y en todo tipo de trasplantes de órgano sólido: corazón, riñones, hígado, páncreas e intestino (33–37).

En cuanto al reservorio, aunque el ser humano es el principal hospedador, se ha descrito la capacidad de otros mamíferos de infectarse por *S. stercoralis* (25). Recientemente se ha demostrado que, en áreas de alta endemicidad y con medidas de higiene deficientes, los perros que conviven con personas son portadores de haplotipos de *S. stercoralis* no solo específicos de los perros, sino también del ser humano (38).

1.7. Cuadros clínicos

La primoinfección por *S. stercoralis* suele producirse a edades tempranas y, a consecuencia de los ciclos de autoinfección, lo más común es la infección crónica asintomática o con sintomatología muy leve, especialmente en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, en inmunodeprimidos se pueden dar cuadros graves como el síndrome de hiperinfección y la infección diseminada. La variada sintomatología que puede producir este helminto está relacionada con su ciclo biológico:

- Pacientes asintomáticos: en las diferentes series de casos descritas en la literatura, se estima que aproximadamente la mitad de los pacientes infectados no presenta ningún síntoma clínico (10,11), siendo la eosinofilia la única alteración analítica que se detecta hasta en el 75% de estos casos asintomáticos (39). Además de los niveles de eosinófilos, también se pueden encontrar elevados los niveles séricos de inmunoglobulina E (IgE) total (40).
- Síntomas cutáneos: la entrada de la larva filariforme a través de la piel produce una reacción cutánea urticariforme característica denominada “picor del suelo” (*ground’s itch*), localizada generalmente en el pie. Estas lesiones tienen aspecto serpenteante y pueden confundirse con la *larva migrans* cutánea,

afección asociada a la entrada y migración a través del tejido cutáneo de uncinarias cuyo hospedador definitivo son otros animales (41). En los casos de autoinfección externa, es decir, cuando la larva filariforme penetra a través del área perianal, los trayectos serpenteantes son más profundos y la migración del parásito es más rápida que en el caso de la infección primaria. En este caso, la migración es intradérmica y avanza a una velocidad de entre 5 y 15 cm por hora, por lo que el aspecto de las lesiones es distinto a la *larva migrans* cutánea. A este tipo lesión se le denomina *larva currens*, suele aparecer en los márgenes anales y en la parte alta de los muslos y es el único signo patognomónico de la estrongiloidiasis (42) (Figura 3). Existen casos descritos de *larva currens* en otras localizaciones como tórax y espalda (43). Este cuadro clínico suele durar horas o días, aunque puede dar recurrencias durante meses, años o incluso después de varias décadas (44–46).

- Síntomas respiratorios: los síntomas respiratorios aparecen aproximadamente una semana después de la entrada del parásito a través de la piel. La larva produce una irritación al llegar a la garganta para ser posteriormente deglutida. En la fase aguda de la infección se puede producir una neumonía eosinofílica denominada síndrome de Loeffler, aunque no es muy común (47). En las infecciones crónicas se pueden dar episodios de fiebre y neumonitis recurrentes que se suelen confundir con neumonías bacterianas (48). En los casos de hiperinfección, los síntomas respiratorios son más graves (tos, disnea, sibilancias, hemoptisis, etc.) y pueden llegar a ser fatales, llegando incluso a producir fallo respiratorio (49).
- Síntomas gastrointestinales: la clínica digestiva en la mayoría de los casos, es leve e inespecífica. Síntomas como dolor epigástrico, diarrea, náuseas, vómitos, estreñimiento y pérdida de peso son comunes en los casos de infección crónica. Estos síntomas se vuelven más patentes en los casos de hiperinfección e infección diseminada (50).
- Síndrome de hiperinfección: este cuadro clínico es consecuencia de los ciclos de autoinfección que se producen de manera acelerada, debido principalmente a una alteración en la respuesta inmune celular del hospedador, aunque en algunos casos también se ha descrito en inmunocompetentes (51). Clínicamente, este síndrome se caracteriza por un aumento en la carga y migración del parásito, por lo que se produce una exacerbación de los

síntomas gastrointestinales y pulmonares. Es característica la aparición de abundantes larvas filariformes y rabadiformes en muestras de esputo y heces. En algunos casos, incluso adultos y huevos pueden llegar a aparecer en heces (49). A diferencia de la infección diseminada, las larvas aparecen en los lugares habituales por los que pasa el parásito en su ciclo biológico. Los principales factores de riesgo son el tratamiento con corticoides, trasplante de precursores hematopoyéticos, alcoholismo, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e infección por el virus linfotrópico de células T humanas 1 (*Human T-Lymphotropic Virus 1*, HTLV-1) (14).

- **Infección diseminada:** la infección diseminada se define como la migración del parásito hacia órganos que no están incluidos en el ciclo biológico habitual, aunque en muchas ocasiones es difícil diferenciar de la hiperinfección, por lo que se suelen utilizar los dos términos indistintamente. El parásito arrastra en su superficie bacterias entéricas y provoca la traslocación de éstas a otros órganos como los pulmones, hígado, corazón, riñones y sistema nervioso central. Como consecuencia de esto, se producen bacteriemias polimicrobianas y meningitis recurrentes causadas por enterobacterias y *Enterococcus* spp., especialmente en pacientes coinfectados con HTLV-1 (52,53). La mortalidad de la infección diseminada es mayor del 60%, debido principalmente a la falta de sospecha clínica y, por tanto, al retraso en el diagnóstico y al tratamiento específico tardío (54).



Figura 3. *Larva currens* en área perianal, muslo y espalda.

1.8. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la estrongiloidiasis es un reto, no solo por su clínica leve y en muchos casos asintomática, sino por las propias limitaciones de las técnicas diagnósticas debido a la baja carga parasitaria, especialmente en el caso de las infecciones crónicas. Por tanto, el diagnóstico de laboratorio se basa en técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares.

1.8.1. Técnicas parasitológicas

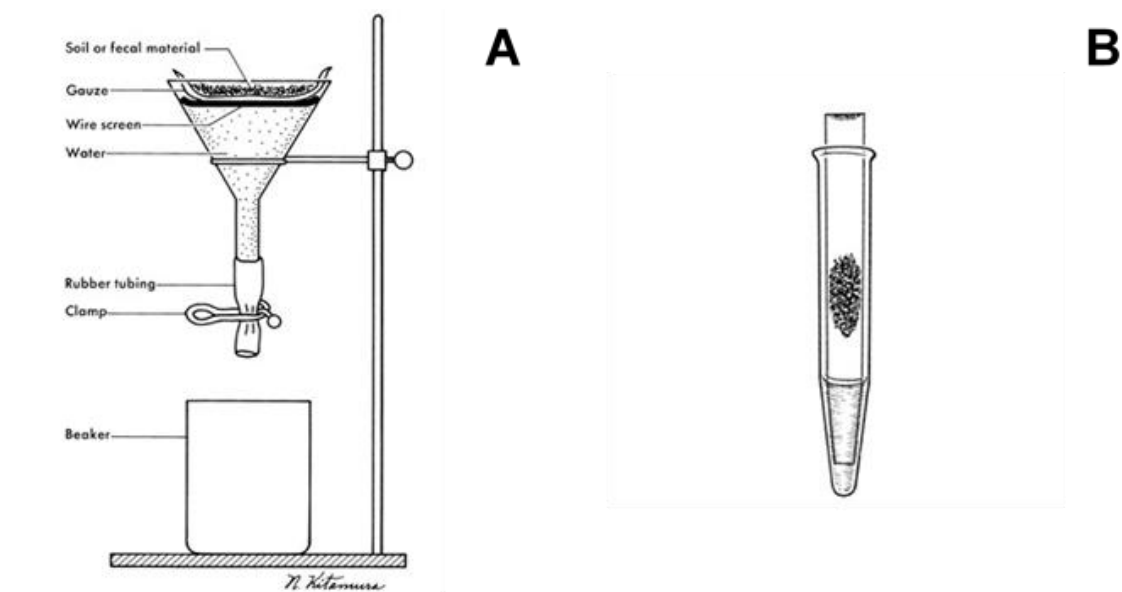
Debido a su característico ciclo, las técnicas convencionales de diagnóstico coproparasitológico no son lo suficientemente sensibles, ya que la carga parasitaria es mucho menor que en otras parasitosis y la expulsión de larvas en heces es irregular (55,56). Aunque poseen una alta especificidad, la visualización directa de las heces y los métodos de concentración como, por ejemplo, el método formalina-éter, tienen sensibilidades por debajo del 60% (57). A lo largo de la historia se ha intentado mejorar el rendimiento de estas técnicas aumentando el número de muestras analizadas por paciente, describiéndose así sensibilidades del 50% y del 70% si se analizan 3 y 7 muestras respectivamente (58). Sin embargo, son las técnicas basadas en la migración de las larvas las consideradas más sensibles para el diagnóstico de la estrogiloidiasis. La técnica de Baermann o el método de Harada-Mori (Figura 4), han demostrado tener un mayor rendimiento que la visualización directa o la concentración de heces (58). No obstante, es el cultivo de heces en placa de agar (*Agar-plate culture*, APC) el método considerado más sensible actualmente, aumentando entre 2 y 4 veces la eficiencia diagnóstica de la concentración con formalina-éter (59) y hasta 15 veces la de la visualización directa (60). Este método fue aplicado por primera vez para el diagnóstico de *S. stercoralis* por Arakaki et al. en 1988 (61), aunque tres años antes Panosian et al. ya había descrito dos casos de estrogiloidiasis diagnosticados por los “caminos de bacterias” encontrados en las placas de agar inoculadas con heces y esputo para el cultivo rutinario de bacterias (62). La técnica APC consiste en la detección de los rastros de bacterias que dejan las distintas fases del parásito al migrar por la placa de agar (Figura 5).

Este método ha ido sufriendo distintas modificaciones, recomendándose la observación de las placas con microscopio, el sellado con cinta para evitar que las larvas se salgan de la placa, el pretratamiento de los cultivos positivos con formalina para inactivar las larvas y la centrifugación de la suspensión de las larvas en formalina para realizar la posterior visualización del sedimento en el microscopio óptico (63,64) (Figura 6).

Esta técnica no es solo específica de *S. stercoralis*, sino que también puede detectar las larvas de uncinarias puesto que, aunque en este último caso, las formas que se expulsan en heces son los huevos, estos pueden eclosionar en el cultivo y liberar la larva rabditidorme. Por ello, tras la detección de las larvas en los cultivos

positivos, es necesaria la identificación microscópica y diferenciación de las larvas de estos helmintos (Figura 7).

Las condiciones y el tiempo de incubación de las placas también han sido objeto de modificaciones. Aunque en un principio, Arakaki et al. recomendaba 24 horas de incubación a 37°C, posteriormente se observó que, si bien *S. stercoralis* se recuperaba principalmente en el primer día de incubación, en algunos casos se detectaba hasta en el sexto día (65). Además, se ha descrito que las uncinarias tardan más en detectarse en el APC, ya que la forma expulsada en heces son los huevos, y que toleran peor que *Strongyloides* temperaturas por encima de los 30°C (64). De esta forma, para favorecer la detección tanto de *S. stercoralis* como de las uncinarias, la recomendación actual, según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), es incubar las placas a temperatura ambiente (25-30°C) durante 7 días (66). Sin embargo, no es raro encontrar estudios recientes en los que el tiempo de incubación es menor de una semana (67–69). Este es un factor importante puesto que, tanto en los estudios de prevalencia como en estudios de comparación o evaluación de nuevas técnicas diagnósticas, la reducción del periodo de incubación del APC conlleva una disminución del número de casos detectados. Esto podría subestimar la prevalencia real de la infección, así como sobreestimar la sensibilidad (disminuir por tanto la especificidad) de las técnicas evaluadas. Además, como ocurre en el diagnóstico parasitológico convencional, la tasa de detección del APC aumenta cuanto mayor es el número de muestras de heces, recomendando algunos autores hasta 7 muestras para alcanzar la máxima sensibilidad (70–72). Por último, las larvas, también pueden detectarse en otras muestras como biopsias gástricas, esputos, aspirados, lavados broncoalveolares, e incluso en líquido cefalorraquídeo en el caso de la infección diseminada (73).



(Adaptado de Isenberg HD, ed. *Clinical microbiology procedures handbook* Washington DC: American Society for Microbiology, 1992)

Ambos métodos se basan en la migración de larvas hacia el agua tibia. Se examina la presencia de larvas móviles en el agua tras 8 horas de incubación en el método de Baermann y 10 días de incubación en el Harada-Mori.

Figura 4. Técnica de Baermann (A) y método de Harada-Mori (B).



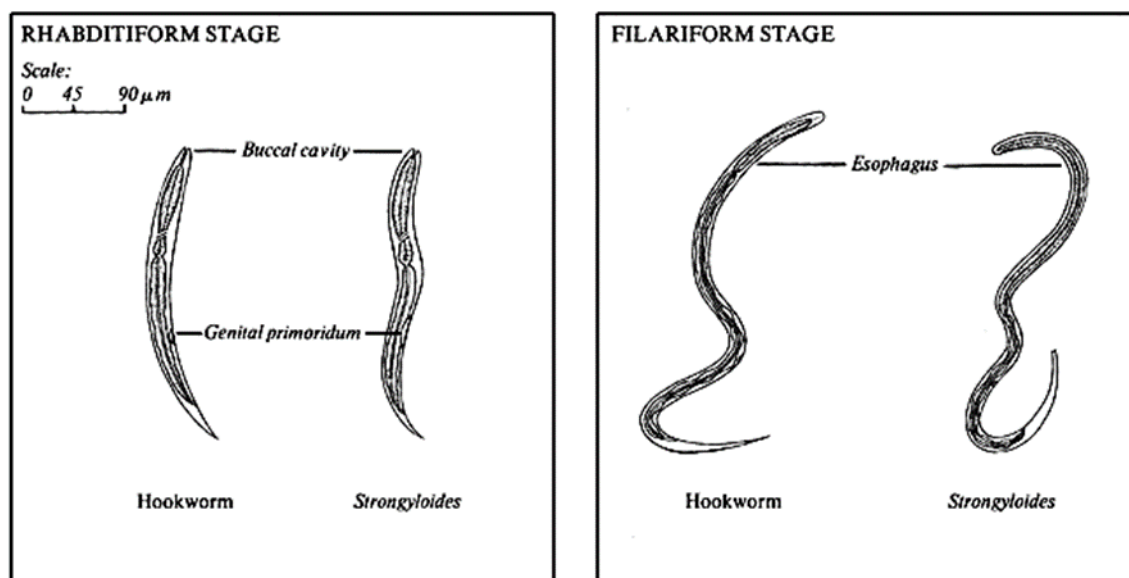
(Fuente: archivo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre)

Figura 5. Cultivo en placa de agar positivo.



(Fuente: archivo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre)

Figura 6. Larvas rhabditiforme (izquierda) y filariforme (centro y derecha) de *S. stercoralis* observadas en cultivo en placa de agar.



(Fuente: <https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Strongylodiasis/morphology.html>)

Las larvas rhabditiformes de *Strongyloides* tienen la cavidad bucal más corta y el primordio genital más grande que las de uncinarias. Las larvas filariformes de las uncinarias poseen una vaina estriada y cola en punta, mientras que las de *Strongyloides* no tienen vaina y la cola es bifurcada.

Figura 7. Diferenciación de las larvas de *Strongyloides* spp. y uncinarias.

1.8.2. Técnicas serológicas

La detección de anticuerpos específicos frente a *S. stercoralis* presenta una mayor sensibilidad que el diagnóstico parasitológico. Gracias a su alto valor predictivo negativo, la serología se utiliza como *screening* de estrongiloidiasis crónica en inmigrantes de área endémica, así como en viajeros y pacientes inmunodeprimidos, aunque se han descrito sensibilidades más bajas en estos últimos casos (74,75). La detección de anticuerpos se realiza frecuentemente con kits comerciales basados en técnicas de inmunoabsorción ligada a enzimas (*Enzyme-linked immuno-sorbent assay*, ELISA), ya que son más sencillos de realizar y en algunos casos se pueden automatizar. Existen otras metodologías como el LIPS (*Luciferase immunoprecipitation system*) (76) y el IFAT (*Immunofluorescence antibody test*) (77), las cuales muestran una mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas ELISA pero, debido a la complejidad y al coste de su realización, su uso suele estar restringido a laboratorios de referencia. Hasta el año 2014 todos los ELISA comerciales utilizaban suspensión de antígenos del parásito (CrAg) (78), sin embargo, se han descrito reactividades cruzadas con otros parásitos como *Toxocara* spp., filarias y uncinarias (79–82). De esta manera, los pacientes originarios de áreas donde algunos de los citados parásitos son co-endémicos van a necesitar un manejo clínico y terapéutico distinto dependiendo del resultado de esta serología (83), por lo que es trascendental desarrollar test serológicos más específicos. En los últimos años se han comercializado nuevos ELISAs, algunos de ellos utilizando antígenos más específicos que el CrAg, como el ELISA basado en el antígeno recombinante NIE (84). Por tanto, es necesario validar estas nuevas pruebas diagnósticas en el ámbito clínico y definir su utilidad en el *screening* de rutina de la estrongiloidiasis en nuestro medio.

1.8.3. Técnicas moleculares

Para intentar solucionar el problema de sensibilidad de las técnicas coproparasitológicas sin perder especificidad, en los últimos años las técnicas moleculares, en concreto la reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR), han supuesto un importante avance en el ámbito de la parasitología. Aunque existen algunos estudios que evalúan tanto la PCR convencional como la PCR anidada (*Nested-PCR*) (85,86), la técnica de PCR más ampliamente utilizada es la PCR a tiempo real (*Real time-PCR*, RT-PCR) (87–89). En cuanto a las dianas de amplificación para el diagnóstico específico de *Strongyloides*, la región ITS (*Internal*

transcribed spacer) y la región que codifica la citocromo c oxidasa han sido utilizadas por algunos autores (85,87), pero es la secuencia que codifica el ARN 18S ribosomal la región más ampliamente usada para el diagnóstico (26,87,88,90,91). Al igual que ocurre en otras infecciones, el desarrollo de PCRs multiplex también ha llegado al área de la parasitología, y diversos estudios han incluido *S. stercoralis* en los paneles de detección de patógenos gastrointestinales (92–94). A pesar del desarrollo de estas técnicas moleculares, es difícil estimar la rentabilidad diagnóstica debido a varias razones. Por un lado, la heterogeneidad de los estudios realizados en cuanto a tipo de población (edad, inmunosupresión), al propio diseño del estudio (casos controles, cohortes), así como al área geográfica en el que se centran (endémica, no endémica). También influye el tipo de PCR evaluada (región amplificada, técnica convencional o a tiempo real, PCR dirigida o PCR multiplex). Por otra parte, las propias carencias del diagnóstico tradicional de la estrongiloidiasis son limitantes para la evaluación de las técnicas moleculares ya que, como se ha comentado anteriormente, no existe un buen gold-estándar puesto que las técnicas parasitológicas no son lo suficientemente sensibles y las técnicas serológicas son poco específicas. Por tanto, las cifras de sensibilidad y especificidad descritas en los distintos estudios deben ser analizadas individualmente, teniendo en cuenta los métodos de referencia elegidos. De esta manera, la sensibilidad de la PCR se estima en torno al 65% cuando se utilizan como gold-estándar las técnicas parasitológicas y disminuiría al 57% cuando se usa la serología como técnica de referencia (90). A pesar de que, en otro tipo de infecciones como la tuberculosis o la malaria, los métodos moleculares han demostrado ser muy útiles, y a menudo más sensibles que las técnicas convencionales, en el diagnóstico de la estrongiloidiasis los resultados son bastante heterogéneos y, en general, la sensibilidad está por debajo de las técnicas parasitológicas. Sultana et al., tras describir una tasa de detección de la RT-PCR de solo el 15% en infecciones de baja carga parasitaria, concluye que esta falta de sensibilidad se podría deber, además de al reducido número de larvas y a la expulsión intermitente de estas en heces, al menor volumen de heces analizado en el caso de la RT-PCR en comparación con el APC o la técnica de Baermann, a la distribución irregular de larvas en la muestra y a la posible degradación del ADN parasitario, debido a la congelación de las muestras durante largos periodos de tiempo (91). Por último, la falta de estandarización de los protocolos de conservación de muestras, de extracción de ADN y de realización de PCR es otro factor limitante de la técnica, ya que no está muy extendida en la rutina de los

laboratorios y generalmente se realiza en centros de referencia de países desarrollados (26).

Además de la PCR, existen otras técnicas moleculares como el LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) que, por su mayor simplicidad en cuanto a su realización e interpretación, podrían ser una buena opción para estudios de prevalencia o incluso para su implantación en la rutina diagnóstica, especialmente en países con recursos limitados (95,96).

1.9. Tratamiento de la estrogiloidiasis

El tratamiento antihelmíntico específico de *S. stercoralis* tiene como objetivos eliminar la infección en los casos sintomáticos, prevenir las complicaciones en los casos asintomáticos e interrumpir los ciclos de autoinfección para erradicar por completo el parásito.

Actualmente, el tratamiento de elección de la infección crónica por *S. stercoralis* es la ivermectina (200 µg/kg en 2 días) (97), ya que este fármaco actúa sobre las fases adultas y larvarias del parásito. Los benzimidazoles (albendazol y tiabendazol) solo tienen efecto sobre las fases adultas, por lo que son menos eficaces que la ivermectina. En una reciente revisión realizada por Gotuzzo et al (98), en la cual se evaluó el porcentaje de pacientes con estrogiloidiasis crónica que negativizaban los tests parasitológicos tras los distintos tratamientos, se determinó que la eficacia del tiabendazol es equivalente a la de la ivermectina (69% vs. 74%), aunque el primero produce más efectos adversos gastrointestinales. El albendazol, por su parte, es menos eficaz que la ivermectina (48% vs. 84%). Sin embargo, es el albendazol (400 mg 2 veces al día durante 7 días). el tratamiento considerado alternativo a la ivermectina (97), ya que está comercializado en más países que el tiabendazol.

En cuanto al tratamiento de la hiperinfección/infección diseminada, no existen ensayos aleatorizados en pacientes con este cuadro clínico. Se recomienda la administración diaria de ivermectina oral (200 µg/kg) durante un mínimo de 2 semanas, o bien hasta que los tests parasitológicos permanezcan negativos durante 2 semanas. Además, si es posible, se recomienda reducir el grado de inmunosupresión para favorecer el aclaramiento del parásito. En pacientes con intolerancia oral, malabsorción o íleo paralítico, la ivermectina administrada por vía parenteral o rectal a las dosis previamente descritas, ha demostrado ser eficaz (99).

1.10. Seguimiento de los pacientes tras el tratamiento específico

Al igual que ocurre con el diagnóstico, no existe un gold-estándar para determinar la cura. Debido a la sensibilidad subóptima de las técnicas parasitológicas, una prueba parasitológica negativa no excluye la posibilidad de seguir teniendo el parásito, puesto que, como se ha comentado anteriormente, la expulsión es irregular. Esto es un factor clave a la hora de diseñar ensayos clínicos y de evaluar la eficacia terapéutica de los distintos fármacos antihelmínticos, ya que, con diseños inadecuados en los que solo se remita una muestra de heces por paciente, la eficacia del tratamiento probablemente será sobreestimada (100). Se recomienda, por tanto, el seguimiento mediante técnicas parasitológicas, preferiblemente APC o Baermann, durante al menos 1 año post-tratamiento para asegurar la cura parasitológica (73). En cuanto al seguimiento serológico, varios autores han propuesto estrategias para definir la cura serológica, si bien hay que tener en cuenta distintos aspectos como la detección de larvas en heces pretratamiento, la variabilidad de las propias técnicas serológicas, los puntos de corte utilizados y el nivel de positividad de las muestras antes del tratamiento. Kobayashi et al. definió la cura serológica como la negativización de la serología post-tratamiento o bien el descenso del ratio (serología de seguimiento/serología de diagnóstico) a niveles $<0,6$, ya que observó que pacientes con títulos serológicos más altos en el diagnóstico tardaban más en negativizar la serología, o incluso no llegaban a negativizarla en un periodo de seguimiento de 18 meses (101). Por su parte, Loutfy et al. observó que la proporción de pacientes que cumplían el criterio de cura descrito previamente por Kobayashi aumentaba con el tiempo (102), alcanzando el 90% a los 6 meses del tratamiento. Por ello, clásicamente se ha considerado cura serológica la obtención de un ratio post/pretratamiento menor de 0,6 en menos de 6 meses. Además de la serología, la monitorización del nivel de eosinófilos también ha sido usada para evaluar la respuesta al tratamiento, aunque debido a que otras infecciones parasitarias o enfermedades alérgicas pueden cursar también con eosinofilia, es necesario combinarla con otras técnicas específicas de la estrongiloidiasis, como por ejemplo la ya citada serología (103). Según las recientes guías de *screening* y tratamiento publicadas por Requena-Méndez et al., el seguimiento de la estrongiloidiasis se debería hacer con la técnica más sensible disponible, realizando la serología antes del tratamiento y repitiéndola a los 6 y 12 meses después para monitorizar su negativización o la disminución del ratio (104).

1.11. Otros aspectos de la infección por *S. stercoralis*

1.11.1. *Strongyloides* y enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, endémica en Latinoamérica al igual que la estrongiloidiasis, está producida por el protozoo hemático *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite por la picadura de los reduvidos. Diversos estudios realizados en nuestro país han explorado la correlación entre estas dos infecciones. Por una parte, Salvador et al. describió una mayor probabilidad de detectar *T. cruzi* en sangre con PCR en pacientes con parasitosis intestinal (105) y, posteriormente, el mismo grupo concretó que la infección por *S. stercoralis* aumentaba la probabilidad de tener parasitemia por *T. cruzi* (106). Actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el que ocurre esto, ya que no se han realizado estudios en humanos. Existen modelos animales que describen un aumento de la detección de *T. cruzi* en sangre en los casos de coinfección con otros helmintos de las familias *Taenidae* o *Trichostrongylidae* (107,108). De esta manera, una posible explicación podría ser que *S. stercoralis* aumenta la respuesta inmune de perfil Th2, de forma que se reduce la respuesta Th1, la cual es responsable de controlar la infección aguda por *T. cruzi*. La desregulación de la respuesta inmune favorecería el aumento de parasitemia de *T. cruzi* y, por lo tanto, existiría una mayor probabilidad de detectar al parásito por PCR en sangre periférica. Por su parte, Puerta-Alcalde et al. describe que pacientes con enfermedad de Chagas tienen hasta dos veces más riesgo de tener también estrongiloidiasis, independientemente de los factores epidemiológicos y de la coinfección con otros parásitos intestinales (109). Por todo ello, además de por la dificultad del diagnóstico clínico y la morbi-mortalidad asociada a ambas infecciones, el *screening* serológico conjunto de Chagas y estrongiloidiasis en la población inmigrante latinoamericana es recomendable.

1.11.2. *Strongyloides* y HTLV-1

El HTLV-1 es un retrovirus con ARN de cadena sencilla, capaz de integrarse y persistir en el genoma escapando de la respuesta inmune del hospedador. Infecta los linfocitos T y se transmite principalmente por leche materna, por vía sexual y por vía sanguínea. Al igual que *S. stercoralis*, es endémico en Japón, África, el Caribe y Latinoamérica, por lo que es común la coinfección con estos dos microorganismos. Los pacientes coinfectados con *Strongyloides* y HTLV-1 tienen una respuesta

inmunitaria modificada frente al parásito. En estos pacientes, el HTLV-1 hace que los niveles de interferón gamma e interleucina (IL) 10 sean más altos que en pacientes solo con estrongiloidiasis. De esta manera, el HTLV-1 favorece la respuesta inmunitaria Th1, por lo que disminuye la activación de los eosinófilos (regulada por el perfil Th2), los niveles de IgE y la IL-5. Por tanto, se reduce la respuesta inmune frente al parásito, favoreciendo el desarrollo de cuadros de estrongiloidiasis grave y sin eosinofilia (110). Además, el HTLV-1 reduce la eficacia del tratamiento de *S. stercoralis*, siendo comunes cuadros recurrentes asociados a la infección diseminada, como por ejemplo las meningitis (111). De este modo, el HTLV-1 es considerado el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la estrongiloidiasis diseminada (112).

1.11.3. *Strongyloides* y alcoholismo

La prevalencia de *S. stercoralis* en pacientes alcohólicos crónicos es significativamente mayor que en no alcohólicos. También se ha demostrado que esta prevalencia aumenta cuanto más grave es el nivel de alcoholismo (113), existiendo diferentes factores que pueden explicarlo. Por un lado, el descuido en la higiene personal en estos pacientes podría aumentar el riesgo de tener nematodos intestinales en general (114), y de *Strongyloides* en particular, ya que se favorecerían los ciclos de autoinfección externa por las larvas presentes en los residuos fecales en el área perianal. Por otro lado, la ralentización del tránsito intestinal en estos pacientes debido a los efectos del etanol en las células musculares intestinales y a la estimulación vagal, favorecería también los ciclos de autoinfección interna y externa. De esta manera, la larva rabaditiforme tendría más tiempo para evolucionar a larva filariforme en el hospedador y volver a penetrar a través de la mucosa intestinal o bien por la piel de los márgenes perianales. Además, se ha visto que los niveles altos de cortisol producidos durante la intoxicación etílica estarían relacionados con la infección por *S. stercoralis* de distintas maneras. El cortisol tiene una estructura muy similar a la ecdisona, compuesto que aumenta la fertilidad de las hembras parásitas adultas y acelera la evolución de las larvas rabaditiformes a filariformes, lo cual supone un aumento tanto de la carga parasitaria como del riesgo de autoinfección. Asimismo, el propio efecto del cortisol sobre el sistema inmune juega un papel importante ya que produce un aumento de IL-18, la cual, junto con la acumulación de neutrófilos en el tejido intestinal, altera la función inmunológica del tracto gastrointestinal, aumentando la permeabilidad de este tejido, lo cual podría predisponer a la infección diseminada

por *S. stercoralis*. Por último, los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y de macrófagos duodenales están también reducidos en los alcohólicos, algo que podría tener un papel importante en la alta incidencia de estrongiloidiasis intestinal en esta población (115).

2. Justificación

El aumento del número de viajeros y de los movimientos poblacionales, asociados a la inmigración y a los refugiados, ha hecho que las enfermedades tropicales importadas no sean algo extraordinario en la rutina asistencial de los hospitales españoles, por lo que es indispensable conocer la epidemiología, la clínica y el diagnóstico de estas enfermedades y que su abordaje sea multidisciplinar.

La estrongiloidiasis es una infección que, al ser en su mayoría asintomática, pasa desapercibida no solo para el paciente, sino en muchas ocasiones para el propio personal sanitario. La gravedad de los cuadros que puede llegar a producir en población inmunodeprimida hace imprescindible un adecuado *screening* y diagnóstico de laboratorio.

Por ello, se planteó conocer la infección por *S. stercoralis* de manera global, con el objetivo de adquirir una perspectiva lo más completa posible de esta enfermedad parasitaria. Se decidió estudiar las características clínico-epidemiológicas de los casos diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre, el seguimiento de dicha población y las carencias y posibles mejoras en el diagnóstico de laboratorio que se realiza en el Servicio de Microbiología, siendo el principal propósito la mejora de la calidad asistencial en el ámbito de las enfermedades importadas.

3. Objetivos

1. Calcular las tasas de incidencia de estrongiloidiasis y las características clínico-epidemiológicas de los casos de infección por *S. stercoralis* diagnosticados en el área de estudio y en el periodo establecido.
2. Evaluar la utilidad de las técnicas serológicas y parasitológicas, así como de los niveles de eosinófilos, para el seguimiento post-diagnóstico.
3. Conocer la situación del diagnóstico de laboratorio de *S. stercoralis* y analizar las posibles mejoras a implantar.
4. Validar la RT-PCR en heces como técnica de confirmación diagnóstica de *S. stercoralis* en casos con serología positiva y sin detección del parásito en heces mediante los métodos parasitológicos convencionales [APC y visualización directa del concentrado (VD)].
5. Evaluar una nueva técnica serológica comercial basada en antígenos recombinantes para su uso como *screening* de estrongiloidiasis y determinación del punto de corte óptimo de dicha técnica en función del factor de riesgo epidemiológico del paciente.
6. Establecer el tiempo óptimo de incubación del APC.

4. Material y métodos

El trabajo se estructura en 3 partes:

1. Incidencia de estrongiloidiasis y características clínico-epidemiológicas de los pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre en un periodo de 5 años.
2. Análisis de la evolución clínico-analítica de pacientes con estrongiloidiasis tratada en el Hospital Universitario 12 de Octubre.
3. Análisis de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *S. stercoralis* utilizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre.
 - 3.1. Análisis de la evolución de las técnicas diagnósticas durante el periodo de estudio.
 - 3.2. Evaluación de dos técnicas serológicas comerciales.
 - 3.3. Establecimiento del tiempo óptimo de incubación del APC.

4.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características clínico-epidemiológicas de los pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre en un periodo de 5 años

4.1.1. Diseño del estudio

Estudio observacional con parte retrospectiva (junio 2013-julio 2016) y parte prospectiva (agosto 2016- octubre 2018).

En agosto de 2016 se llevó a cabo una búsqueda retrospectiva a través del Sistema Interno del Laboratorio (SIL) del Hospital Universitario 12 de Octubre de todos los casos de estrongiloidiasis diagnosticados por cualquiera de las técnicas disponibles en el laboratorio desde junio de 2013 hasta esa fecha.

De agosto de 2016 a octubre de 2018 se incluyeron prospectivamente todos aquellos pacientes con diagnóstico de estrongiloidiasis.

4.1.2. Marco

El Hospital Universitario 12 de Octubre es un centro de referencia del área sur de Madrid. Se trata de un hospital de tercer nivel de 1300 camas y que tiene adscritos 19 Centros de Atención Primaria y Especializada. El área atendida está compuesta por los distritos de Usera, Villaverde y Carabanchel. En esta área, la población está compuesta por entre un 11% y un 15% de inmigrantes procedentes de áreas donde la estrongiloidiasis es endémica (Tabla 2), por lo que entre 60.000 y 76.000 personas habrían estado potencialmente expuestas a la infección en algún momento de su vida.

Tabla 2. Población empadronada general y población empadronada inmigrante de área endémica (Latinoamérica, África, Asia y Oceanía) en el área atendida por el Hospital Universitario 12 de Octubre en el periodo de estudio.

Año de estudio	Continente de origen			Total inmigrantes n (%) N=Total población	Total población empadronada
	Latinoamérica n (%) N=Total inmigrantes	África n (%) N=Total inmigrantes	Asia y Oceanía n (%) N=Total inmigrantes		
2013	53.740 (69,9)	10.576 (13,8)	12.512 (16,3)	76.828 (14,6)	527.753
2014	46.145 (67,0)	10.015 (14,5)	12.708 (18,4)	68.868 (13,3)	518.475
2015	39.047 (63,4)	9.355 (15,2)	13.164 (21,4)	61.566 (12,0)	513.573
2016	38.572 (61,4)	9.825 (15,6)	14.372 (22,9)	62.769 (11,9)	526.490
2017	38.969 (64,2)	8.420 (13,9)	13.266 (21,9)	60.655 (11,6)	521.397
2018	45.697 (62,1)	10.334 (14,1)	17.494 (23,8)	73.525 (13,9)	530.721

[Fuente: Portal web del Ayuntamiento de Madrid; Padrón Municipal de Habitantes por Distritos (116)]

4.1.3. Participantes

Se incluyeron todos aquellos pacientes que cumplieron estos criterios de inclusión:

- Ser atendidos en el Hospital Universitario 12 de Octubre o en cualquiera de los Centros de Atención Primaria o Atención Especializada adscritos al mismo.
- Tener positiva alguna de las técnicas diagnósticas de *S. stercoralis* disponibles en la cartera de servicios del Laboratorio de Microbiología (ver siguiente apartado).

4.1.4. Técnicas diagnósticas

En el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, el diagnóstico de rutina de *S. stercoralis* se basa en las siguientes técnicas.

4.1.4.1. Técnicas parasitológicas

- Visualización directa (VD) de las larvas en muestras de heces después de la concentración mediante el método formalina-éter (117) (SAF Fijativo Real®): aproximadamente 1 g de heces se homogenizan en una solución de formalina, se filtran y se añade dos veces su volumen de éter etílico. Después, la emulsión se centrifuga, se desechan las tres primeras capas del sobrenadante y se realiza la visualización del sedimento con lugol en el microscopio óptico.

Se observa la preparación completa con los objetivos de 10x y de 40x. Esta técnica se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Técnica agar-cultivo en placa (APC): esta técnica se realiza de acuerdo con las recomendaciones de la SEIMC (66). Se depositan aproximadamente 3 g de heces frescas en una placa de agar-sangre, se sellan con cinta y se incuban a temperatura ambiente durante 7 días. Se revisan diariamente las placas en busca de “caminos” o “rastros” con crecimiento bacteriano formados por el arrastre de estas bacterias por las larvas. En caso de que se visualicen estos rastros, se realiza un arrastre del agar con un asa de cultivo tras inundar la placa con formalina al 10%. Se centrifuga y se realiza la visualización del sedimento al microscopio. Se realiza la búsqueda activa de larvas de *S. stercoralis* y se identifican las características que permiten distinguirlas de las larvas de uncinarias. Las larvas filariformes de *S. stercoralis* tienen cola bifurcada y no tienen vaina, mientras que las de uncinarias tienen vaina y la cola terminada en punta. En cuanto a las larvas rabaditiformes, la menor longitud de la cavidad bucal de *S. stercoralis* en comparación con la cavidad bucal de la larva rabaditiforme de las uncinarias es la principal característica diferencial (Figura 7).

4.1.4.2. Técnicas serológicas

La técnica utilizada es la detección de inmunoglobulina G (IgG) específica de *S. stercoralis* mediante ELISA comercial en microplaca (SciMedx® Corporation, Denville, NJ, USA), la cual se solicita en los siguientes tipos de pacientes:

- Inmigrantes de áreas endémicas (descritas anteriormente) o pacientes europeos con antecedentes de viajes a áreas endémicas, con síntomas gastrointestinales, cutáneos o respiratorios que podrían estar relacionados con la infección por *S. stercoralis*, con o sin eosinofilia.
- Inmigrantes o pacientes europeos con antecedentes de viajes a áreas endémicas, asintomáticos y con eosinofilia.
- Inmigrantes asintomáticos o pacientes europeos con antecedentes de viaje a áreas endémicas antes de terapias inmunosupresoras, VIH-positivos y/o pacientes hemato-oncológicos.

En casos concretos, también se solicita esta técnica en pacientes europeos sin antecedentes de viajes a áreas endémicas, pero con síntomas gastrointestinales,

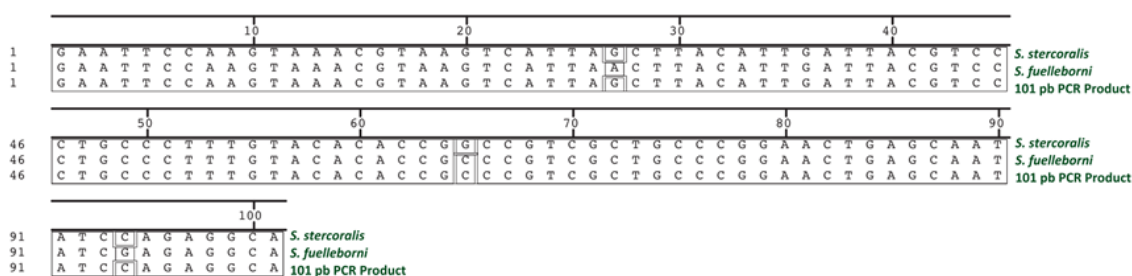
cutáneos o respiratorios, con o sin eosinofilia, después de haber descartado otros diagnósticos, o bien en pacientes asintomáticos con eosinofilia no justificada por otras causas.

Esta técnica serológica utilizada en la rutina del laboratorio se basa en una suspensión de antígenos crudos del parásito (CrAg-ELISA). La realización de esta técnica y la interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se definieron como positivas aquellas muestras que presentaron una absorbancia [Densidad óptica (DO)] ≥ 0.2 y como negativas aquellas que tuvieron una absorbancia (DO) < 0.2 . Los resultados se expresaron como índice (DO de la muestra/0.2).

Al inicio del estudio, los lavados del ELISA se realizaban con pipeta multicanal. Después de observar un aumento en el número de serologías positivas sin confirmación parasitológica en pacientes sin factores de riesgo, especialmente en el año 2016, la casa comercial recomendó realizar estos lavados mediante agitación enérgica de la microplaca. Por tanto, desde principios de 2017 hasta el final del estudio, los lavados se realizaron de esta manera.

4.1.4.3. Técnicas moleculares

La RT-PCR en heces de pacientes con serología positiva y técnicas parasitológicas negativas se incluyó gradualmente en el diagnóstico de rutina de la strongiloidiasis. Las muestras se enviaron al Centro Nacional de Microbiología (CNM), donde realizan dicha técnica. De junio de 2015 a junio de 2016 se realizó en pacientes seleccionados; de junio de 2016 a octubre de 2018 se realizó a todos los pacientes con serología positiva y estudio de heces negativo (VD y/o APC) con muestras suficientes para su envío. Esta RT-PCR, descrita por Saugar et al. (88), amplifica una región de 101 pares de bases (pb) del gen 18S ribosomal de *Strongyloides* spp. (Figura 8). La diferencia principal de esta técnica en comparación con lo descrito por otros autores es la concentración de las heces antes de la extracción del ADN para aumentar el rendimiento de la RT-PCR.



[99,0% de identidad para *S. stercoralis*; 98,0% de identidad para *S. fuelleborni*. Adaptado de Saugar et al. (85)]

Figura 8. Secuencia consenso amplificada por la RT-PCR.

4.1.5. Clasificación de pacientes

Debido a la falta de un gold-estándar diagnóstico para la estrongiloidiasis, se clasificó a los pacientes teniendo en cuenta no solo las técnicas diagnósticas anteriormente descritas, sino también la presencia o ausencia de eosinofilia [absoluta (≥ 500 eosinófilos/ μL) o relativa (< 500 eosinófilos/ μL y $> 5\%$ de eosinófilos)] y los factores de riesgo epidemiológico (país de origen endémico para estrongiloidiasis y/o viaje a país endémico y/o antecedente de trabajo en arrozales de la costa mediterránea) (Figura 9 y Figura 10).

De esta manera, se definieron los siguientes grupos de pacientes:

- **Casos confirmados:** pacientes con detección de larvas de *S. stercoralis* en heces por técnicas parasitológicas, independientemente del resultado de la serología, o bien pacientes con serología positiva, RT-PCR positiva en heces y factores de riesgo epidemiológico.
- **Casos no confirmados:** pacientes con serología positiva y técnicas parasitológicas y/o moleculares negativas o no realizadas. Estos pacientes fueron reclasificados según la presencia o ausencia de factores de riesgo epidemiológico y eosinofilia:
 - **Casos probables:** pacientes con factores de riesgo epidemiológico y con eosinofilia.
 - **Casos posibles:** pacientes con factores de riesgo epidemiológico y sin eosinofilia.

- Casos indeterminados: pacientes no incluidos en ninguno de los grupos anteriores:
 - a) Pacientes sin factores de riesgo epidemiológico pero con serología positiva y RT-PCR positiva en heces (i.e.: posibles casos autóctonos vs. falsos positivos de la RT-PCR).
 - b) Pacientes sin factores de riesgo epidemiológico con serología positiva aislada.

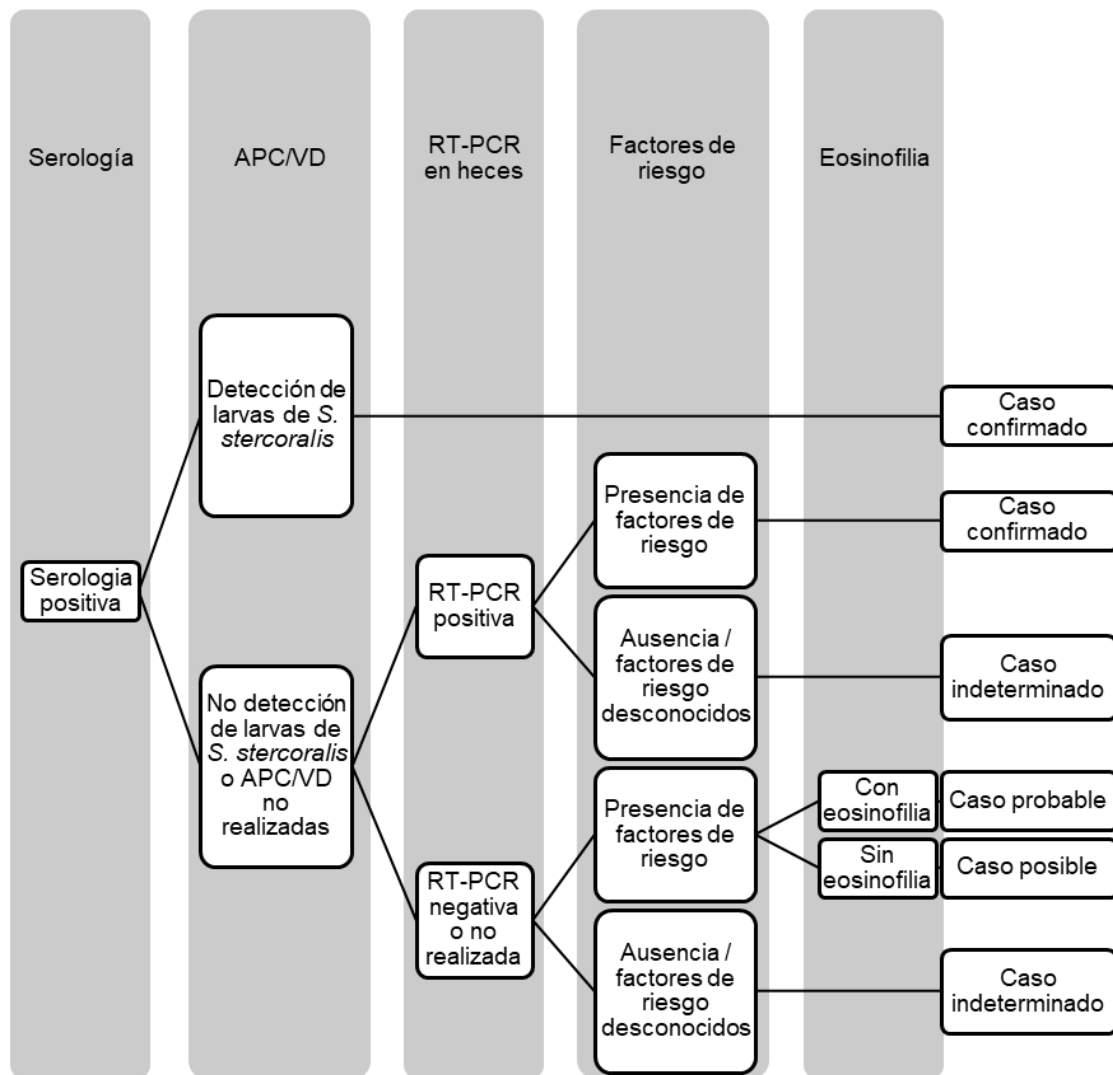


Figura 9. Clasificación de casos en pacientes con serología positiva.

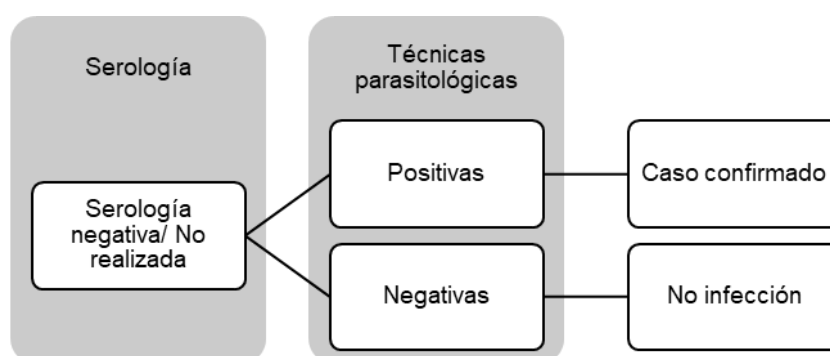


Figura 10. Clasificación de casos en pacientes con serología negativa o no realizada.

4.1.6. Variables

Se incluyeron las siguientes variables mediante la revisión de la historia clínica electrónica de los pacientes incluidos en el estudio.

4.1.6.1. Variables sociodemográficas

Género
Edad
País de origen
Continente de origen
Tiempo de estancia en España hasta el diagnóstico (años)
Viajes a área endémica de strongiloidiasis: Se consideraron áreas endémicas de strongiloidiasis Latinoamérica, África, Asia y Oceanía (5)
Tiempo transcurrido desde el regreso del último viaje (meses)
Tipo de paciente según factores de riesgo
Inmigrante: paciente nacido en área endémica de strongiloidiasis
Viajero: paciente nacido en área no endémica y que ha realizado algún viaje a área endémica de strongiloidiasis
Servicio de solicitud del diagnóstico
Motivo de consulta

4.1.6.2. Variables clínicas no atribuibles a la infección por *S. stercoralis*

Inmunosupresión
Coinfección VIH
Carga viral [copias/ml] en el momento del diagnóstico de <i>S. stercoralis</i>
Niveles de CD4 [células/mm ³] en el momento del diagnóstico de <i>S. stercoralis</i>
Tratamiento antirretroviral en el momento del diagnóstico de <i>S. stercoralis</i>
Coinfección HTLV-1: desde mayo de 2015 se comenzó a hacer cribado sistemático a todos los pacientes con una serología de <i>Strongyloides</i> positiva con índice mayores de 1,5
Otras causas de inmunosupresión
Trasplantado hematológico
Trasplantado de órgano sólido
Tratamiento inmunosupresor
Corticoides
Otros inmunosupresores
Otro tipo de inmunosupresión
Comorbilidades
Diabetes Mellitus
Dislipemia
Hipertensión arterial
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
Neoplasia
Insuficiencia renal
Insuficiencia hepática
Obesidad
Alcoholismo
Otras

4.1.6.3. Otras enfermedades infecciosas

Enfermedad de Chagas [Confirmada por dos técnicas serológicas basadas en antígenos distintos Architect® Chagas (Abbott Laboratories Wiesbaden, Germany) y una técnica inmunocromatográfica (Bio Line, Standard Diagnostics)]

Alguna PCR positiva de Chagas en sangre periférica

Otras enfermedades infecciosas

Tuberculosis

Malaria

Leishmaniasis

Filariasis

Parasitosis intestinal

Detección de anticuerpos frente a otros parásitos (coinfecciones/posibles reactividades cruzadas): los resultados se expresaron cualitativamente (Positivo/Negativo)

Fasciola spp.: se realizó una técnica comercial de hemaglutinación indirecta (HAI) [Distomiasis Fumouze®, (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France)]

Schistosoma spp.: se realizó una técnica comercial de HAI (Schistosomiasis Fumouze®, Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France)

Toxocara spp: se realizó una técnica comercial de ELISA en microplaca (SciMedx® Corporation, Denville, NJ, USA)

Taenia solium (cisticercosis): se realizó una técnica comercial de ELISA en microplaca (SciMedx® Corporation, Denville, NJ, USA)

Trichinella spp.: se realizó una técnica comercial de ELISA en microplaca (SciMedx® Corporation, Denville, NJ, USA)

Echinococcus granulosus.: se realizó una técnica comercial automatizada de ELISA de quimiluminiscencia (VirCLIA®, Vircell, España)

Entamoeba histolytica: se realizó una técnica comercial de aglutinación con partículas de látex [Bichro-Latex Amibe Fumouze Test (Fumouze® Diagnostics, Levallois-Perret, France)]

4.1.6.4. Variables clínicas y de tratamiento relacionadas con la infección por *S. stercoralis*

Sintomático/asintomático
Síntomas cutáneos
Urticaria
Prurito
<i>Larva currens</i>
Otros síntomas cutáneos
Síntomas digestivos
Diarrea
Dolor abdominal
Náuseas
Dispepsia
Estreñimiento
Vómitos
Otros síntomas gastrointestinales
Síntomas respiratorios
Tos
Asma
Expectoración
Otros síntomas respiratorios
Otros síntomas
Hiperinfestación/Infección diseminada
Tratamiento específico
Ivermectina (200 µg/kg en 2 días consecutivos o en 2 días separados por 2 semanas)
Albendazol (400 mg/12 horas durante 5 días)
Otras pautas
Tratamiento desconocido: pacientes en los que se registra tratamiento para la estrongiloidiasis pero no especifican fármaco ni pauta

4.1.6.5. Variables analíticas y de diagnóstico

Variables analíticas
Número de eosinófilos (eosinófilos/ μ L) [valores de referencia: 0-500 eosinófilos/ μ L]
Porcentaje de eosinófilos (%) [valores de referencia: 0-5%]
Tipo de eosinofilia
Eosinofilia absoluta: ≥ 500 eosinófilos/ μ L
Eosinofilia leve: 500-999 eosinófilos/ μ L
Eosinofilia moderada: 1000-2999 eosinófilos/ μ L
Eosinofilia grave: > 3000 eosinófilos/ μ L
Eosinofilia relativa: $> 5\%$ eosinófilos con ≤ 500 eosinófilos/ μ L
Niveles de IgE (kU/L) [valores de referencia: < 100 kU/L]
Variables de diagnóstico
Diagnóstico serológico
Resultado cualitativo y cuantitativo de la serología de <i>S. stercoralis</i>
Índice [DO señal (S)/DO cut-off (CO)] de la técnica: [Positivo S/CO ≥ 1 , negativo S/CO < 1]
Diagnóstico parasitológico
Número de muestras de heces remitidas al laboratorio de microbiología
Resultado de la visualización directa del concentrado de heces
Resultado del APC
Tiempo que tarda en positivizar el APC (<i>Time To Positivity</i> , TTP)
Diagnóstico molecular
Resultado de la RT-PCR en heces

4.1.7. Registro de datos

Se diseñó una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel para Windows. Los pacientes se codificaron mediante un sistema de disociación de datos.

4.1.8. Análisis estadístico

Los casos indeterminados se excluyeron del análisis estadístico general. Los casos confirmados, probables y posibles se analizaron. Se calcularon las tasas de incidencia en la población general del área atendida por el hospital [n° de casos importados (inmigrantes y viajeros)/100.000 habitantes], así como en la población inmigrante de área endémica (n° de casos en inmigrantes/100.000 inmigrantes) por año de estudio. Se registraron las características sociodemográficas, clínicas, analíticas,

microbiológicas y de tratamiento. El análisis por subgrupos se llevó a cabo mediante análisis univariante para evaluar la asociación de las distintas variables registradas. Se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para evaluar la distribución normal de las variables analizadas. La prueba t de Student y la prueba de Chi-cuadrado se aplicaron para las variables continuas y categóricas con distribución normal. La prueba U de Mann Whitney y las pruebas exactas de Fischer se aplicaron cuando las variables no se ajustaban a la distribución normal. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% (IC95%). Valores p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los subgrupos comparados fueron: casos confirmados vs. casos no confirmados, pacientes inmunosuprimidos vs. pacientes inmunocompetentes y casos sintomáticos vs. casos asintomáticos. Se realizó análisis multivariante por regresión logística mediante la técnica por pasos hacia atrás para identificar los factores asociados con los distintos grupos de pacientes. Las variables con valores p menores de 0,20 en el análisis univariante se incluyeron en el modelo. El análisis estadístico se realizó con el software STATA V15 para Windows (StataCorp, College Station, TX, USA).

4.2. Análisis de la evolución clínico-analítica de pacientes con estrongiloidiasis tratada en el Hospital Universitario 12 de Octubre

4.2.1. Diseño del estudio

Estudio observacional prospectivo realizado en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

4.2.2. Población de estudio

Se incluyeron los casos de la cohorte principal del estudio desde septiembre de 2016 hasta octubre de 2018, que además cumplieran los siguientes criterios:

- Serología positiva de *S. stercoralis* en el diagnóstico.
- Ser caso confirmado, probable o posible según la clasificación del apartado 4.1.5 Clasificación de pacientes.
- Tratamiento específico de *Strongyloides* prescrito y administrado.
- No haber realizado viajes a área endémica en el periodo entre las visitas del estudio.
- Disponer de al menos una muestra serológica de seguimiento dentro del periodo de estudio.

En nuestro centro, tal y como recomiendan las guías (97), el tratamiento de elección prescrito para la estrongiloidiasis es la ivermectina oral 200 µg/kg/día (en dos días consecutivos o dos días separados por una semana). Sin embargo, en pacientes puntuales, como es el caso de pacientes coinfectados con otros helmintos (*Toxocara* spp., *Echinococcus* spp.) se prescribe albendazol o mebendazol.

4.2.3. Diagnóstico y seguimiento de los pacientes

Se recogieron los datos de laboratorio (número total y porcentaje de eosinófilos, serología de *Strongyloides*, VD y APC) en la visita de diagnóstico y en las visitas de seguimiento. Desde agosto 2016, los pacientes que eran remitidos a la consulta de Medicina Interna/Infecciosas se incluyeron en un protocolo de seguimiento clínico y de laboratorio (Anexo 1. Material suplementario).

Debido a la falta de información clínica en la mayoría de los casos, no se registró la fecha exacta de toma del tratamiento, por lo que, para facilitar el análisis de datos, los periodos de seguimiento se establecieron tomando como referencia la fecha de toma de muestras. Además, los periodos de seguimiento fueron muy heterogéneos, ya que dependieron del servicio que solicita el diagnóstico, de la disponibilidad de los pacientes e incluso del propio clínico. Por tanto, se reclasificaron para su análisis de la siguiente manera:

- Visita de diagnóstico.
- Menos de dos meses post-diagnóstico.
- De 2 a 6 meses post diagnóstico.
- De 6 a 12 meses post diagnóstico.
- De 12 a 18 meses post diagnóstico.
- Más de 18 meses post diagnóstico.

Se definió un periodo adicional (menos de 6 meses y más de 6 meses post diagnóstico) ya que es el periodo clásicamente definido para determinar la cura serológica (101,102). En los pacientes con más de un resultado perteneciente al mismo periodo, se recogió la información de la primera visita.

4.2.4. Definición de cura

Se definieron tres tipos de curas y fracasos, dependiendo de la técnica diagnóstica:

- Técnicas parasitológicas: se definió como *cura parasitológica* a los casos con detección de larvas en heces de *S. stercoralis* por cualquier técnica en el diagnóstico (VD, APC o RT-PCR) y tests parasitológicos negativos (VD y APC) en el seguimiento. Se consideró *fracaso parasitológico* a la detección de larvas en heces por VD y/o APC en cualquier visita de seguimiento después del tratamiento. La RT-PCR en heces no se realizó en las muestras de seguimiento. Para la *cura parasitológica* se evaluaron solo los casos confirmados que tuvieran alguna muestra de heces de seguimiento. Para el *fracaso parasitológico* se evaluaron los casos confirmados, probables y posibles que tuvieran alguna muestra de heces de seguimiento.
- Técnicas serológicas: se evaluaron casos confirmados, probables y posibles. Se consideraron pacientes con *cura serológica* a aquellos que tenían una serología positiva en el diagnóstico y negativa en el seguimiento, o bien un

ratio DO seguimiento/DO diagnóstico menor o igual a 0,6 en menos de 6 meses post-diagnóstico (101,102). Los pacientes en los que el ratio DO seguimiento/DO diagnóstico fue mayor de 0,6 a los 6 o más meses post-diagnóstico, se definieron como *fracaso serológico*. Los casos en los que el ratio DO seguimiento/DO diagnóstico fue mayor de 0,6 pero no se disponía de muestra de suero después de los 6 meses post-diagnóstico, se clasificaron como *posibles fracasos serológicos*.

- Nivel de eosinófilos: se evaluaron los pacientes con eosinofilia absoluta o relativa al diagnóstico. Se definió como *cura analítica* a tener eosinofilia relativa o absoluta en el diagnóstico y nivel de eosinófilos normal en la última visita de seguimiento, o bien un descenso de al menos el 50% en el número de eosinófilos con respecto al diagnóstico en el último seguimiento. El *fracaso analítico* se definió como persistencia de eosinofilia en el último seguimiento analítico disponible.

4.2.5. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de la evolución serológica y analítica de los pacientes en los distintos periodos de seguimiento preestablecidos. Se aplicó la prueba U de Mann Whitney para la comparación de los índices serológicos y del nivel de eosinófilos pre y post-diagnóstico, en función del periodo de seguimiento (menor o mayor de 6 meses). Valores p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los fracasos de tratamiento según cada uno de los criterios se analizaron independientemente. El análisis estadístico se realizó con STATA V15 para Windows (StataCorp, College Station, TX, USA).

4.3. Análisis de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *S. stercoralis* utilizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre

4.3.1. Análisis de las técnicas diagnósticas de laboratorio en el periodo de estudio

Tras realizar el estudio descriptivo de los casos de estrongiloidiasis en el periodo 2013-2016 (Anexo 2. Producción científica) y observar una gran proporción de pacientes con serología de *S. stercoralis* positiva y sin detección del parásito en heces, desde el Servicio de Microbiología se planteó mejorar el diagnóstico de laboratorio mediante distintos abordajes:

- Implantación de la RT-PCR en heces en la rutina diagnóstica en los casos con serología positiva y VD y APC negativos.
- Cambio en la técnica de lavado del ELISA SciMedx®.
- Recomendaciones a los médicos peticionarios (mediante llamada telefónica o a través del sistema informático del laboratorio) acerca de la recogida de muestras y petición de pruebas diagnósticas de *S. stercoralis*:
 - Recogida de al menos 3 muestras de heces frescas (no conservadas en nevera), preferiblemente en días alternos, para la realización del APC en los pacientes con serología positiva.
 - Petición de serología y técnicas parasitológicas (VD y APC) simultáneamente.

4.3.1.1. Diseño del estudio

Estudio observacional desde el punto de vista del Servicio de Microbiología. Se analizaron las técnicas diagnósticas de *S. stercoralis* realizadas entre junio de 2013 y octubre de 2018. El algoritmo diagnóstico de la estrongiloidiasis antes de la introducción de la RT-PCR en la rutina diagnóstica se basaba en la combinación de técnicas serológicas y parasitológicas (Figura 11). La RT-PCR en heces se realizó en casos seleccionados desde junio de 2015 hasta junio de 2016. Desde junio de 2016 hasta octubre de 2018, la RT-PCR se realizó en todos los inmigrantes de áreas endémicas con serología positiva, técnicas parasitológicas negativas y muestra suficiente para su envío al CNM (Figura 12).

Se calculó el rendimiento de las técnicas parasitológicas y se compararon las tasas de detección de la VD, del APC y de la RT-PCR por años y en el periodo total de estudio.

Se calculó la proporción de pacientes con serología positiva y confirmación diagnóstica del parásito en heces mediante técnicas parasitológicas y/o RT-PCR por año. Además, se analizó el aumento en la proporción de casos confirmados tras la inclusión en el diagnóstico de la RT-PCR en heces y el cambio en la técnica de lavado del ELISA. Para ello, debido a que la introducción de la RT-PCR en la rutina diagnóstica fue gradual entre los años 2015 y 2016 y a que la mejora en la realización de los lavados del ELISA SciMedx® se realizó a principios de 2017 (ver apartado 4.1.4. Técnicas diagnósticas), se establecieron dos periodos de tiempo en los cuales no influyeran estos dos cambios:

- **Periodo A:** junio 2013-diciembre 2014. Periodo anterior a la introducción de la RT-PCR en heces en la rutina diagnóstica y con realización de los lavados del ELISA SciMedx® con pipeta multicanal.
- **Periodo B:** enero 2017-octubre 2018. Periodo posterior a la implementación de la RT-PCR en heces en la rutina diagnóstica y con realización de los lavados del ELISA SciMedx® con agitación energética.



Figura 11. Algoritmo diagnóstico de la estrongiloidiasis antes de la introducción de la RT-PCR en heces (junio 2013-junio 2015).

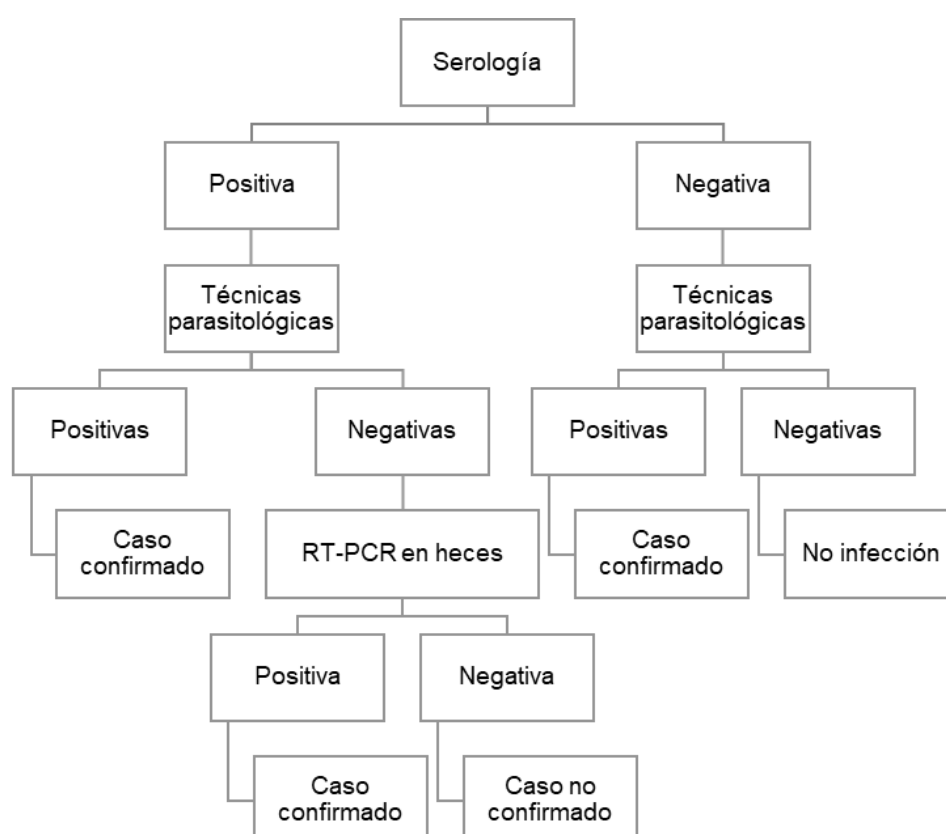


Figura 12. Algoritmo diagnóstico de la estrongiloidiasis después de la introducción de la RT-PCR en heces (junio 2015-octubre 2018).

4.3.1.2. Población de estudio

Se incluyeron todos aquellos pacientes con serología de *S. stercoralis* positiva y muestra de heces remitida al Servicio de Microbiología en el periodo junio 2013-octubre 2018.

4.3.1.3. Técnicas diagnósticas

Ver apartado 4.1.4. Técnicas diagnósticas.

4.3.1.4. Variables

Se registraron las siguientes variables: fecha de diagnóstico, resultado cualitativo y cuantitativo de la serología de *S. stercoralis*, número de muestras de heces remitidas por paciente y resultados de la VD, del APC y de la RT-PCR en heces (ver apartado 4.1.6. Variables).

4.3.1.5. Registro de datos

Ver apartado 4.1.7. Registro de datos.

4.3.1.6. Análisis estadístico

Las tasas de detección de las técnicas parasitológicas se calcularon por muestra (n° de tests positivos/ n° total de tests realizados) y por paciente (n° de pacientes con test positivos/ n° total de pacientes con test realizados) en cada año y en el periodo total del estudio. En el caso de la RT-PCR solo se calculó la tasa de detección por paciente, ya que la técnica se realizó en pool de muestras de heces cuando se disponía de más de una muestra.

Se comparó la proporción de casos confirmados en pacientes con serología positiva, así como el número de técnicas parasitológicas realizadas y positivas por año de estudio. Se comparó la proporción de pacientes con 3 o más muestras de heces remitidas para la realización de las técnicas parasitológicas, la proporción de técnicas parasitológicas realizadas y positivas y la proporción de casos confirmados en los periodos A y B del estudio con los correspondientes IC95%.

Se analizó la diferencia entre los índices serológicos de los casos confirmados por técnicas parasitológicas, los confirmados solo con RT-PCR y los no confirmados con RT-PCR negativa mediante el test U de Mann-Whitney.

Valores p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

El análisis estadístico se realizó con STATA V15 para Windows (StataCorp, College Station, TX, USA).

4.3.2. Evaluación de dos técnicas serológicas comerciales para el diagnóstico de *S. stercoralis*

En esta parte del estudio se evaluó una técnica serológica recientemente comercializada basada en un antígeno recombinante, con el objetivo de comprobar si con su uso se podía reducir el porcentaje de casos no confirmados que se obtenía con la técnica serológica de rutina.

4.3.2.1. Diseño del estudio

Estudio retrospectivo de laboratorio realizado en muestras archivadas de suero de pacientes con serología de *S. stercoralis* realizada desde enero de 2013 hasta octubre de 2016.

4.3.2.2. Población de estudio

Se incluyeron todos los pacientes que acudieron al Hospital Universitario 12 de Octubre y Centros de Atención Primaria y Especializada que tuvieran una serología de *S. stercoralis* realizada con la técnica de rutina en el periodo de estudio y con volumen suficiente de muestra para realizar una segunda técnica serológica.

4.3.2.3. Muestras testadas

Se testaron prospectivamente con la técnica comercial de rutina todas las muestras de suero de los pacientes mencionados en el apartado anterior y se almacenaron a -40°C. Estas muestras se volvieron a testar retrospectivamente con la segunda técnica comercial. Se incluyeron muestras de diagnóstico y de seguimiento. Se definió como muestra de diagnóstico a la primera muestra de un paciente al que no se le había cribado previamente de estrongiloidiasis. Se definió como muestra de seguimiento a aquellas muestras pertenecientes a pacientes que tenían un resultado serológico positivo en una muestra previa.

4.3.2.4. Técnicas diagnósticas

- Técnicas serológicas evaluadas:
 - CrAg-ELISA (SciMedx®; SciMedx, Denville, NJ, USA): técnica de rutina. Ver apartado 4.1.4.2. Técnicas serológicas.
 - NIE-ELISA (NovaLisa®; NovaTec Immunodiagnostics, Dietzenbach, Alemania): ELISA en microplaca basado en el antígeno recombinante NIE.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante: positivo (DO muestra/DO cut-off $>1,1$), equívoco (DO muestra/DO cut-off entre 0,9 y 1,1) y negativo (DO muestra/DO cut-off $<0,9$). La prueba y la interpretación de los resultados se realizó de manera automatizada en el autoanalizador DS2 (DYNEX®; Magellan Biosciences, Chantilly, VA, USA).

- Clasificación de las muestras en función de los resultados obtenidos por las dos técnicas:
 - Concordancia positiva: resultado positivo con CrAg-ELISA y NIE-ELISA.
 - Concordancia negativa: resultado negativo con CrAg-ELISA y NIE-ELISA.
 - Discordancia mayor: resultado positivo con una técnica y resultado negativo con la otra.
 - Discordancia menor: resultado positivo o negativo con CrAg-ELISA y resultado equívoco con NIE-ELISA.

Además de las pruebas serológicas descritas anteriormente, en las muestras discordantes también se realizó la detección de isotipos específicos de inmunoglobulina G1 (IgG1) e IgG4 usando la solución salina de *S. venezuelensis* como antígeno heterólogo (118). Esta técnica se realizó en el CNM.

4.3.2.5. Definición de gold-estándar

Se definió como gold-estándar primario a la detección de larvas de *S. stercoralis* en heces mediante métodos parasitológicos y/o moleculares en al menos una muestra por paciente. Debido al diseño retrospectivo del estudio, una proporción importante de los pacientes incluidos no tenía muestra de heces remitida al laboratorio. Además, por definición, las técnicas parasitológicas tienen una baja sensibilidad, por lo que se definió un gold-estándar compuesto incluyendo factores de riesgo epidemiológico. Los factores de riesgo epidemiológico se definieron como: país de origen endémico y/o viajes a áreas endémicas. Por lo tanto, los pacientes se clasificaron de la siguiente manera:

- Gold-estándar primario: pacientes con técnicas parasitológicas solicitadas.
 - Verdadero positivo: pacientes con detección de larvas de *S. stercoralis* en heces mediante cualquier técnica (VD, APC y/o RT-PCR) en al menos una muestra.

- Verdadero negativo: pacientes sin detección de larvas de *S. stercoralis* en heces y sin exposición potencial al parásito (i.e. pacientes europeos que no han viajado a área endémica).
- Gold-estándar compuesto: pacientes con y sin pruebas parasitológicas solicitadas.
 - Infectado (denominador de sensibilidad): detección de larvas en heces (verdaderos positivos con el gold-estándar primario), o al menos una prueba serológica comercial positiva y algún factor de riesgo epidemiológico.
 - No infectado (denominador de especificidad): pruebas parasitológicas y moleculares negativas (verdaderos negativos con el gold-estándar primario) o no realizadas y resultados serológicos negativos con ambas técnicas, o un resultado serológico positivo con una o ambas técnicas serológicas comerciales y sin factores de riesgo epidemiológico.

4.3.2.6. Análisis estadístico

Se calculó el coeficiente kappa de Cohen (κ) para evaluar la concordancia entre las dos técnicas serológicas (incluyendo muestras de diagnóstico y de seguimiento) y entre cada técnica serológica y los dos gold-estándar (incluyendo solo muestras de diagnóstico). Se excluyeron las muestras de seguimiento para calcular la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) y los puntos de corte óptimos. Los resultados equívocos de la técnica serológica NIE-ELISA fueron considerados negativos. La sensibilidad y especificidad de ambas técnicas se calcularon utilizando los puntos de corte recomendados por el fabricante y puntos de corte hipotéticos. Se recalcularon los valores predictivos para diferentes niveles de prevalencia. La determinación de los puntos de corte óptimos de cada técnica se realizó mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Se calcularon los IC95%. El análisis de datos se realizó con SPSS versión 20.0 para Windows (IBM, Armonk, NY, USA).

4.3.3. Establecimiento del tiempo óptimo de incubación del agar-cultivo

La detección de larvas en heces, como se ha descrito en la introducción, sigue siendo el gold-estándar diagnóstico, siendo el APC la técnica parasitológica más sensible. A pesar de que esta técnica está descrita desde principios de los años 90, el tiempo que las placas se deben mantener en incubación no está estandarizado. Las diferencias oscilan entre menos de 48 horas y más de una semana de incubación, dependiendo del estudio. En esta parte del trabajo, se analizó el tiempo que tardan en detectarse las larvas de *S. stercoralis* mediante APC en la cohorte de pacientes.

4.3.3.1. Diseño del estudio

Estudio observacional desde el punto de vista del laboratorio de Microbiología.

4.3.3.2. Población de estudio

Se incluyeron todos los pacientes con al menos una muestra de heces con detección de *S. stercoralis* positiva con APC entre junio de 2013 y octubre de 2018. Se excluyó a los pacientes que habían recibido tratamiento específico para la estrongiloidiasis previamente.

4.3.3.3. Técnicas diagnósticas

Se registraron las fechas de crecimiento del APC y se calculó el tiempo que tardan en detectarse las larvas en el cultivo (fecha de detección - fecha de registro de la muestra, días) (TTP). Ver apartado 4.1.4. Técnicas diagnósticas.

4.3.3.4. Análisis estadístico

Se calcularon el TTP medio por paciente, el TTP del primer cultivo positivo de cada paciente y los TTP individuales por muestra.

Se realizó análisis univariante comparando variables demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes cuyo TTP medio fue menor de 3 días y de los que tuvieron TTP medio mayor o igual a 3 días, mediante la aplicación de los tests no paramétricos U de Mann-Whitney y el test de Fischer.

Valores *p* menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

El análisis estadístico se realizó con STATA V15 para Windows (StataCorp, College Station, TX, USA).

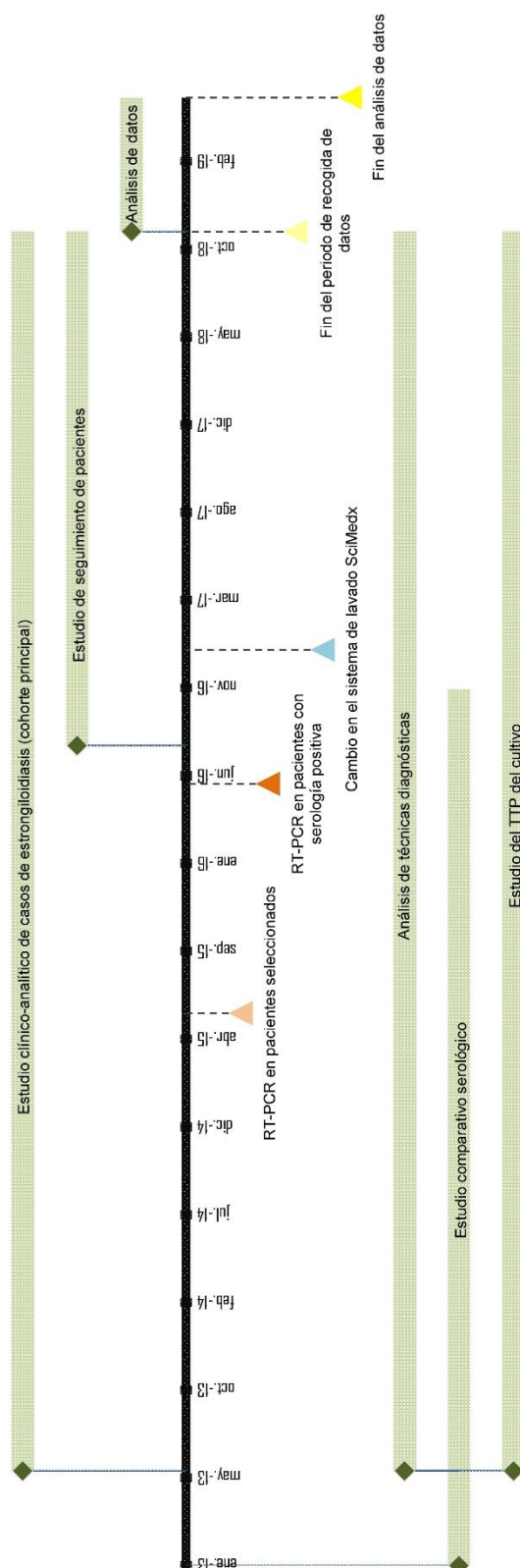


Figura 13. Resumen del plan de investigación del estudio.

5. Aspectos éticos y confidencialidad

Estos estudios se han realizado respetando todos los principios contemplados en la Declaración de Helsinki. Todos los datos recogidos procedentes de la historia clínica de los pacientes incluidos en los diferentes estudios han sido tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con nuestros estudios han sido objeto de comprobación. Esta comprobación ha sido realizada por los investigadores del hospital, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos de carácter personal han sido sustituidos por un código y sólo los investigadores del hospital pueden relacionar dicho código con los pacientes y su información personal.

6. Resultados

6.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características clínico-epidemiológicas de los pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre en un periodo de 5 años

6.1.1. Pacientes incluidos y clasificación

Un total de 314 pacientes tuvieron alguna prueba diagnóstica de *S. stercoralis* positiva. De ellos, 305 pacientes tuvieron serología de *S. stercoralis* positiva; en 8 no se realizó la serología pero se detectaron larvas mediante la VD del concentrado y/o APC; y en un paciente, cuya serología fue negativa, se detectaron larvas en heces (Figura 14 y Figura 15).

De los 314 pacientes iniciales, 276 fueron incluidos en la cohorte general del estudio: 104 casos confirmados, 85 casos probables y 87 casos posibles (Figura 16). Los 38 casos restantes se clasificaron como indeterminados y se analizaron independientemente en el apartado Análisis de los casos indeterminados (Anexo 1. Material suplementario).

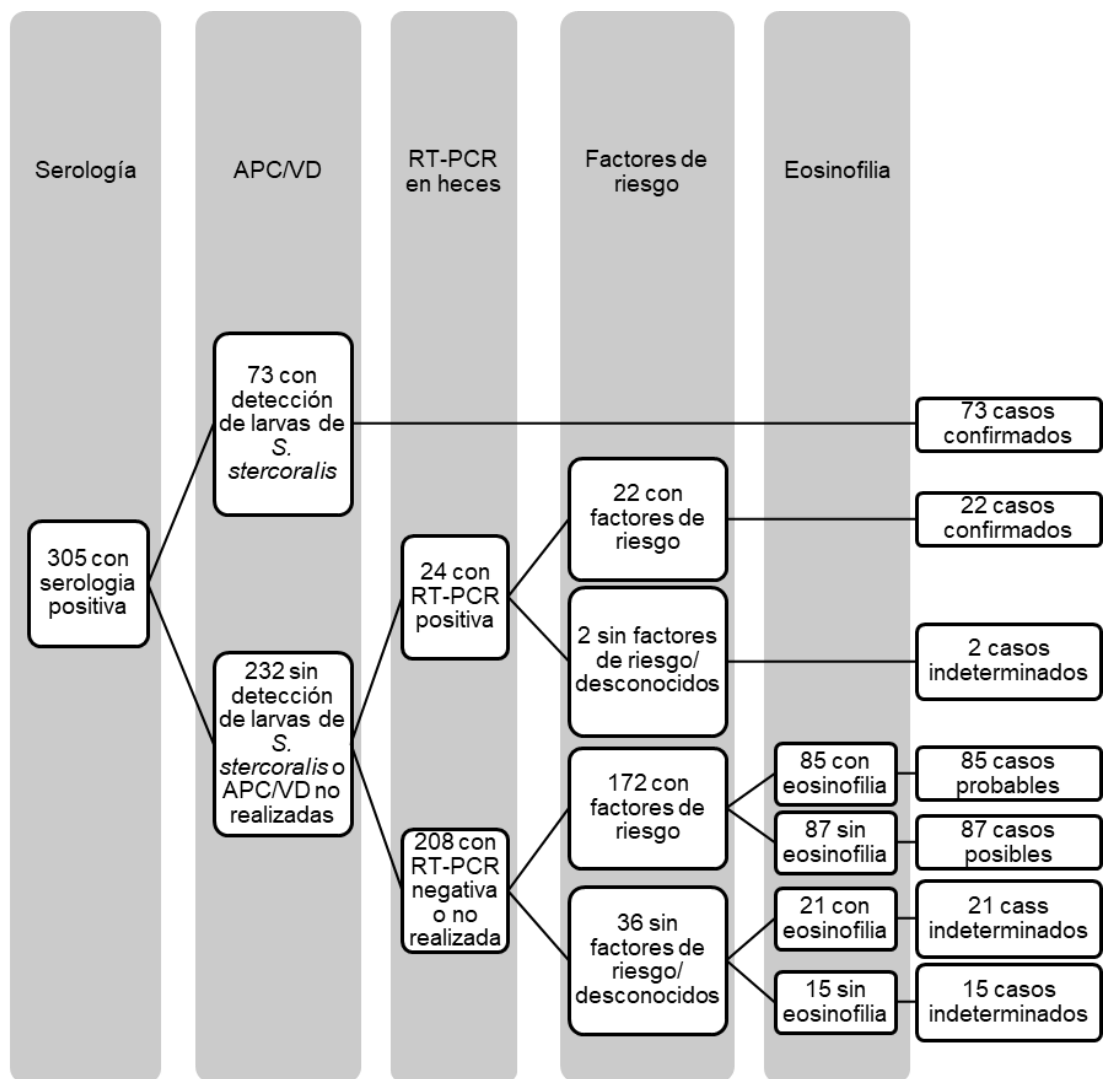


Figura 14. Clasificación de pacientes con serología de *S. stercoralis* positiva (N=305).

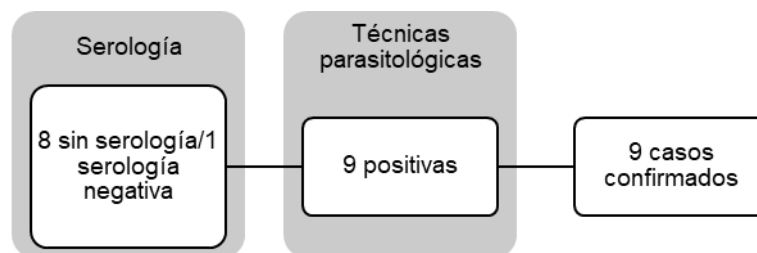


Figura 15. Clasificación de pacientes con serología de *S. stercoralis* negativa o no realizada (N=9).

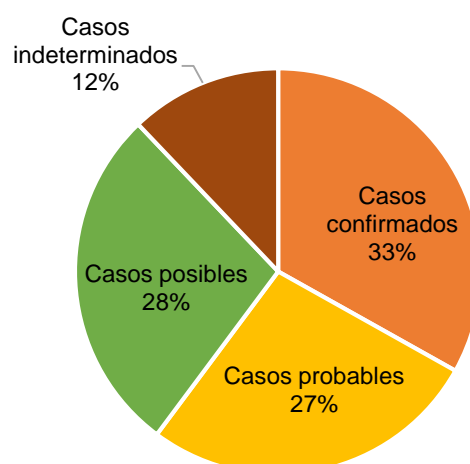


Figura 16. Distribución de pacientes con alguna prueba diagnóstica específica de *S. stercoralis* positiva.

6.1.2. Tasas de incidencia por año de estudio

De los 276 pacientes incluidos en la cohorte general, 263 (95,3%) fueron inmigrantes y 13 (4,7%) fueron viajeros. La tasa de incidencia por años, teniendo en cuenta solo los años completos de estudio (2014-2017), sufrió un aumento de 7,52 casos/100.000 habitantes en 2014 hasta un máximo de 18,42 casos/100.000 habitantes en el año 2016 y disminuyó hasta 9,01 casos/100.000 habitantes en 2017. La tasa de incidencia media en la población general en el periodo de estudio fue de 9,80 casos/100.000 habitantes/año. La tasa de incidencia media en la población inmigrante fue de 75,8 casos/100.000 habitantes/año (Tabla 3 y Figura 17). Las tasas de incidencia medias calculadas solo con los casos confirmados fueron 3,69 y 29,39 casos/100.000 habitantes/año en la población general e inmigrante, respectivamente. Las tasas de incidencia de casos confirmados por años se muestran en la Tabla 19 (Anexo 1. Material suplementario) y en la Figura 17.

Tabla 3. Número de casos y tasa de incidencia de estrongiloidiasis (nº de casos/100.000 habitantes) por año de estudio.

Año	Nº de casos	Tasa de incidencia en población general	Nº de casos en inmigrantes	Tasa de incidencia en inmigrantes de área endémica
Junio-diciembre 2013	21	3,98	20	26,03
2014	39	7,52	35	50,82
2015	38	7,40	36	58,47
2016	97	18,42	92	146,57
2017	47	9,01	47	77,49
Enero-octubre 2018	34	6,41	33	44,88
Media	52	9,80	49	75,80

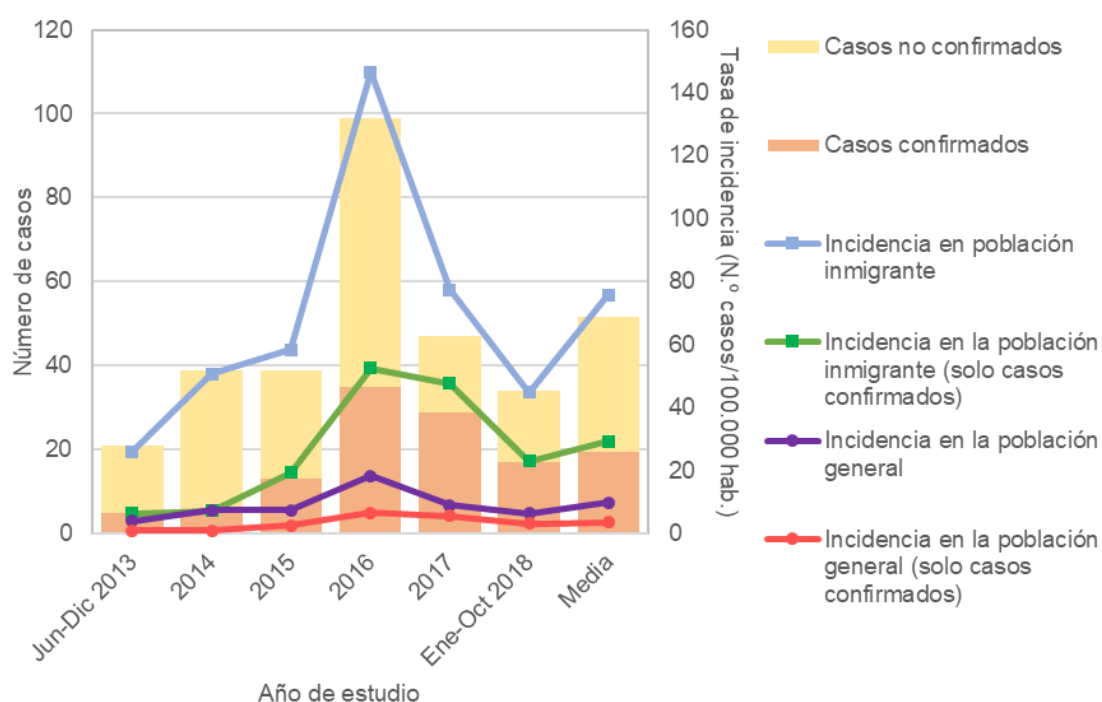


Figura 17. Distribución temporal de la cohorte principal del estudio: número de casos totales y tasas de incidencia anual calculadas con casos totales y con casos confirmados.

6.1.3. Análisis descriptivo de los pacientes incluidos en el estudio

De los 276 pacientes incluidos en la cohorte general, el 48,9% eran hombres con una mediana de edad de 43,5 años [Rango intercuartílico (IQR): 35,5-52,5]. Del total de pacientes, 263 (95,3%) eran inmigrantes, siendo la mayoría de origen latinoamericano (213/263) y, en concreto, Ecuador el principal país de origen (21,7%).

Trece pacientes (4,7%) fueron europeos que habían realizado viajes a área endémica. La distribución de los pacientes según los países de origen se muestra en la Tabla 21 (Anexo 1. Material suplementario). La mediana de tiempo de residencia en España de los pacientes inmigrantes hasta el diagnóstico de estrongiloidiasis fue de 12,4 años (IQR: 8,1-15,8). El principal Servicio que solicitó el diagnóstico fue Medicina Interna/Infecciosas (55,8%), seguido de Alergia (18,5%) (Tabla 4).

En cuanto al estado inmunitario, 53 (19,2%) eran pacientes con algún tipo de inmunosupresión, siendo el VIH (34/53) la causa principal. Un paciente era HTLV-1 positivo. El 27,1% de los pacientes tuvo alguna comorbilidad no infecciosa, siendo el alcoholismo (22/75), la hipertensión arterial (17/75) y la diabetes (17/75) las principales enfermedades (Tabla 5).

En relación a enfermedades infecciosas distintas a la estrongiloidiasis, 29 de los 213 pacientes latinoamericanos (13,6%) estaban diagnosticados de enfermedad de Chagas (24/29 eran bolivianos) y en 26 del total de pacientes (9,4%) se detectaron otros parásitos intestinales aparte de *S. stercoralis*. En cuanto a reacciones cruzadas/coinfecciones con otros parásitos detectadas mediante serología, 26 (9,4%) pacientes tuvieron al menos otra serología de parásitos positiva (18/26 con 1 parásito, 5/26 con 2 parásitos, 2/26 con 3 parásitos y 1/26 con 4 parásitos), siendo *Echinococcus granulosus* y *T. solium* los principales, ya que se detectaron en 12 pacientes cada uno (Tabla 6).

El motivo principal de consulta fue la eosinofilia (22,2%), seguido de los síntomas cutáneos (12,7%). De los 276 pacientes, 128 (46,6%) tenían síntomas sugerentes de infección por *Strongyloides*; la clínica cutánea fue la mayoritaria (59/128), seguida de la digestiva (58/128). No se detectó ningún caso de hiperinfección/infección diseminada, aunque un paciente con detección de larvas de *Strongyloides* en heces tuvo una bacteriemia por *Escherichia coli* de origen desconocido (Tabla 7). En 200 (75,2%) pacientes se prescribió tratamiento antihelmíntico específico, siendo la ivermectina el principal fármaco administrado (189/200) (Tabla 8).

En cuanto a los resultados analíticos, 172 (62,3%) pacientes tuvieron algún tipo de eosinofilia. De los 154 pacientes que tuvieron eosinofilia absoluta, el 60,6% tuvo eosinofilia leve (Tabla 9).

Respecto a las técnicas diagnósticas específicas de *S. stercoralis*, en 268 (97,1%) pacientes se realizó la serología, siendo positiva en 267 de ellos. El único paciente con serología negativa era un paciente con infección por VIH con 27 CD4/ μ L, que fue

diagnosticado al detectarse larvas de *S. stercoralis* en heces mediante APC. En cuanto a las técnicas parasitológicas, 57 (20,6%) casos se diagnosticaron únicamente con APC, 18 (6,5%) con VD y APC y 7 (0,4%) solo con VD. En 22 (8,0%) pacientes el diagnóstico se realizó con RT-PCR en heces (Tabla 10). En la Tabla 22 (Anexo 1. Material suplementario) figura el número de muestras de heces remitidas por paciente.

6.1.4. Análisis univariante y multivariante

Las tablas con el análisis univariante y multivariante completos están en el Anexo 1. Material suplementario.

6.1.4.1. Comparación de casos confirmados vs. casos probables y posibles

Los pacientes que tuvieron detección del parásito en heces eran de mayor edad que los que solo tuvieron serología positiva (47,2 años vs. 41,8 años, $p=0,001$). El origen latinoamericano también se asoció con los casos confirmados (87,1% vs. 77,2%, $p=0,045$), así como con la clínica digestiva (59,6% vs. 35,5%, $p=0,007$). El tratamiento específico se asoció con la confirmación del parásito en heces (93,1 vs. 61,4; $p<0,001$), al igual que con la presencia de alguna comorbilidad (42,3% vs. 26,4%, $p=0,006$). La eosinofilia (83,7% vs. 49,4%, $p<0,001$), en especial la eosinofilia moderada-grave (51,2% vs. 26,4% del total de pacientes con eosinofilia absoluta, $p=0,002$) se asoció con los casos confirmados, siendo por tanto los niveles de eosinófilos significativamente mayores en estos pacientes (1000 células/ μ L vs. 400 células/ μ L, $p=0,002$). Mayores índices de la serología de *S. stercoralis* se asociaron de manera significativa con la detección del parásito en heces (4,5 vs. 2,2, $p<0,001$). Las variables que mostraron una mayor asociación con la detección del parásito en heces tras el análisis multivariante fueron los síntomas digestivos [OR: 2,69 (1,28-5,70), $p=0,009$], el tratamiento específico [OR: 6,93 (2,54-18,92), $p<0,001$], la presencia de alguna comorbilidad [OR: 2,11 (1,10-4,03), $p=0,023$], la eosinofilia absoluta o relativa [OR: 2,11 (1,10-4,03), $p<0,033$], la eosinofilia moderada-grave [OR: 2,43 (1,13-5,20), $p=0,022$] y el mayor índice serológico [OR: 1,19 (1,07-1,32), $p=0,001$].

Aunque no fueron significativas las diferencias, la proporción de hombres (53,9% vs. 45,9%, $p=0,202$) y el porcentaje de pacientes alcohólicos (13,4% vs. 6,6% $p=0,066$) fueron mayores en el grupo de los pacientes confirmados. El porcentaje de pacientes con alguna PCR de Chagas positiva fue 27,3% en el grupo de los confirmados y 5,9% en el grupo de los no confirmados ($p=0,269$) (Tabla 23).

6.1.4.2. Comparación de pacientes inmunosuprimidos vs. inmunocompetentes

La inmunosupresión se asoció con el género masculino (64,2% vs. 45,3%, $p=0,014$) y con origen no latinoamericano (66,7% vs. 84,4%, $p=0,004$). Además, los pacientes con algún tipo de inmunosupresión tuvieron menos síntomas asociados con la infección por *S. stercoralis* que los inmunocompetentes (22,6% vs. 52,3%, $p<0,001$), así como menos eosinofilia absoluta o relativa (43,4% vs. 66,8%, $p=0,002$) y, por tanto, menores niveles de eosinófilos (200 células/ μ L vs. 600 células/ μ L, $p=0,001$). Los índices serológicos de estrongiloidiasis fueron más bajos en el grupo de inmunosuprimidos (2,1 vs. 2,9, $p=0,020$). Tras el análisis multivariante, las variables asociadas con mayor fuerza a la inmunosupresión fueron el género masculino [OR: 2,2 (1,13-4,28), $p=0,020$], ser asintomático [OR: 0,26 (0,13-0,54), $p<0,001$] y la ausencia de eosinofilia en el momento del diagnóstico [OR: 0,30 (0,16-0,59), $p<0,001$] (Tabla 24).

6.1.4.3. Comparación de pacientes sintomáticos vs. asintomáticos

En el grupo de sintomáticos se describe una menor proporción de inmigrantes con respecto a viajeros (90,6% vs. 99,3%, $p=0,001$). Teniendo en cuenta solo a los pacientes inmigrantes, la proporción de latinoamericanos fue significativamente mayor en el grupo de los sintomáticos respecto al de los asintomáticos (87,1% vs 76,0%, $p=0,024$). La proporción de pacientes inmunosuprimidos en el grupo de los sintomáticos fue menor que en el grupo de los asintomáticos (9,4% vs. 27,9%, $p<0,001$). Después de realizar el análisis multivariante, el género masculino [OR: 0,56 (0,35-0,95), $p=0,033$], ser inmigrante [OR: 0,06 (0,01-0,50), $p=0,009$] y la inmunosupresión [OR: 0,28 (0,13-0,58), $p=0,001$] se asociaron negativamente con la presencia de síntomas atribuibles a la estrongiloidiasis.

Aunque no fue estadísticamente significativo, la proporción de pacientes con enfermedad de Chagas fue mayor en el grupo de los asintomáticos (12,7% vs. 23,8%, $p=0,097$), mientras que el porcentaje de pacientes con PCR de Chagas positiva fue mayor en el grupo de los sintomáticos (28,6% vs. 9,5%, $p=0,253$). Los niveles de IgE fueron mayores en los pacientes asintomáticos [1120 kU/L (603-1760)] que en los sintomáticos [304 kU/L (165-1288) ($p=0,068$)] (Tabla 25).

Tabla 4. Características sociodemográficas de los 276 pacientes incluidos en el estudio.

Variable		Frecuencia (%) N=276
Edad [años], mediana (IQR)		43,5 (35,5-52,5)
Género, masculino		135 (48,9)
Immigrantes		263 (95,3)
Continente de origen	Latinoamérica	213/263 (81,0)
	África	42/263 (16,0)
	Asia	8/263 (3,0)
Tiempo de residencia en España [años], mediana (IQR)		12,4 (8,1-15,8)
Tiempo desde el último viaje [meses], mediana (IQR)		21,8 (7,8-44,7)
Viajeros europeos		13 (4,7)
Tiempo desde el viaje [meses], mediana (IQR)		32,5 (6,1-82,8)
Servicio solicitante del diagnóstico		
Medicina interna / Unidad de Enfermedades Infecciosas		154 (55,8)
Alergia		51 (18,5)
Consulta VIH		18 (6,5)
Hematología		9 (3,3)
Dermatología		8 (2,9)
Otros		36 (13,0)

Tabla 5. Inmunosupresión y comorbilidades de los 276 casos de estrongiloidiasis.

Variable	Frecuencia (%) N=276
Pacientes inmunosuprimidos	53 (19,2)
VIH	34/263* (12,9)
Tratamiento antirretroviral en el momento del diagnóstico	19/34 (55,9)
Niveles CD4, [células/mm ³], mediana (IQR)	387,5 (248-600)
Carga Viral, [copias/ml], mediana (IQR)	70 (0-199.556)
HTLV-1	1/152* (0,7)
Causas de inmunosupresión diferentes al VIH y HTLV-1	18 (6,5)
Trasplante órgano sólido	5
Enfermedad reumática en tratamiento	1
Corticoides	11
Otros inmunosupresores	8
Otro tipo de inmunosupresión**	4
Comorbilidades	90 (32,6)
Alcoholismo	22
Hipertensión arterial	17
Dislipemia	17
Diabetes Mellitus	15
Obesidad	12
EPOC	7
Neoplasia	6
Insuficiencia renal	6
Otras comorbilidades	33

* Tests positivos/tests realizados.

** 2 pacientes con inmunodeficiencias; 2 pacientes con Síndrome de Down.

Tabla 6. Otras enfermedades infecciosas.

Variable	Frecuencia (%) N=276
Otras enfermedades infecciosas	
Enfermedad de Chagas	29/151* (19,2)
Tuberculosis**	13 (4,8)
Malaria	4 (1,4)
Leishmania	2 (0,7)
Otras parasitosis intestinales***	26 (9,4)
<i>Blastocystis hominis</i>	7/26
<i>Entamoeba coli</i>	6/26
<i>Endolimax nana</i>	8/26
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4/26
<i>Iodamoeba bustchlii</i>	3/26
<i>Trichuris trichiura</i>	2/26
<i>Hymenolepis nana</i>	1/26
<i>Entamoeba hartmanii</i>	1/26
<i>Giardia lamblia</i>	1/26
Detección de anticuerpos frente a otros parásitos****	26 (9,4)
<i>Echinococcus granulosus</i>	12/62 (19,4)
<i>Toxocara</i> spp.	12/61 (19,7)
<i>Taenia solium</i>	6/17 (35,3)
<i>Entamoeba hystolitica</i>	4/21 (19,1)
<i>Trichinella</i> spp.	2/28 (7,1)
<i>Fasciola</i> spp.	1/20 (5,0)
<i>Schistosoma</i> spp.	1/47 (2,1)

* Pacientes con enfermedad de Chagas/total de inmigrantes latinoamericanos con *screening* de Chagas realizado.

** 9 pacientes tenían tuberculosis latente, 2 miliar, 1 ganglionar y 1 pleural.

*** Diagnosticadas con visualización directa del concentrado de heces.

**** Técnicas positivas/técnicas realizadas.

Tabla 7. Características clínicas.

Variable	Frecuencia (%) N=276
Motivo de consulta	
Eosinofilia	61 (22,2)
Síntomas cutáneos	35 (12,7)
Síntomas digestivos	31 (11,3)
<i>Screening</i> del inmigrante	29 (10,6)
Síntomas respiratorios	20 (7,3)
Seguimiento de VIH	17 (6,2)
Seguimiento de Chagas	15 (5,5)
Síntomas neurológicos	10 (3,6)
Fiebre	10 (3,6)
Otros	47 (16,1)
Síntomas asociados a estrongiloidiasis	128 (46,6)
Síntomas cutáneos	59/128 (46,1)
Urticaria	43/128 (33,6)
Prurito	27/128 (21,1)
<i>Larva currens</i>	5/128 (3,9)
Otros síntomas cutáneos	11/128 (8,6)
Síntomas digestivos	58/128 (45,3)
Diarrea	26/128 (20,3)
Dolor abdominal	24/128 (18,8)
Náuseas	8/128 (6,3)
Dispepsia	8/128 (6,3)
Estreñimiento	6/128 (4,7)
Vómitos	5/128 (3,9)
Otros síntomas gastrointestinales	6/128 (4,7)
Síntomas respiratorios	27/128 (21,1)
Tos	11/128 (8,6)
Asma	9/128 (7,0)
Expectoración	2/128 (1,6)
Otros síntomas respiratorios	12/128 (9,4)
Hiperinfestación/Infección diseminada	0*

* Una posible infección diseminada en paciente con bacteriemia por *E. coli* de origen desconocido.

Tabla 8. Tratamiento específico frente a la estrongiloidiasis.

Variable	Frecuencia (%) N=276
Pacientes no tratados	76* (27,5)
Pacientes tratados	200 (72,5)
Ivermectina	189 (68,5)
Albendazol	4 (1,5)
Ivermectina + albendazol	2 (0,7)
Albendazol + mebendazol	1 (0,4)
Tratamiento desconocido**	4 (1,5)

* De los 76 pacientes en cuya historia clínica no referían tratamiento específico, 8 fueron mujeres embarazadas en las que se recomendó iniciar tratamiento tras el parto y/o lactancia.

** Pacientes en cuya historia clínica refieren tratamiento específico para la estrongiloidiasis, pero no especifican fármacos ni pauta.

Tabla 9. Resultados analíticos.

Variables analíticas	Frecuencia (%) N=276
Presencia de eosinofilia	172 (62,3)
Eosinofilia absoluta	154 (55,8)
Eosinofilia relativa	18 (6,5)
Tipo de eosinofilia	
Eosinofilia leve	93/154 (60,4)
Eosinofilia moderada	58/154 (37,7)
Eosinofilia grave	3/154 (1,9)
Recuento de eosinófilos [células/ μ L], mediana (IQR)	600 (200-1000)
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	7,6 (2,6-13,9)
Niveles de IgE [kU/L], mediana (IQR)	544 (196-1420) [N=59]

Tabla 10. Resultados de las técnicas diagnósticas.

Variables de diagnóstico	Frecuencia (%) N=276
Diagnóstico serológico	
Serología de <i>Strongyloides</i> realizada	268 (97,1)
Serología de <i>Strongyloides</i> positiva	267/268 (99,6)
Índice serológico [S/CO], mediana (IQR)	2,8 (1,7-5,3)
Diagnóstico parasitológico y molecular	
Casos confirmados solo con VD	7 (0,4)
Casos confirmados solo con APC	57 (20,6)
Casos confirmados con VD y APC	18 (6,5)
Casos confirmados solo con RT-PCR	22 (8,0)

6.2. Análisis de la evolución de pacientes con estrongiloidiasis tratada en el Hospital Universitario 12 de Octubre

6.2.1. Análisis descriptivo de los casos de estrongiloidiasis tratados y con seguimiento

Se incluyeron un total de 59 pacientes en el periodo de septiembre de 2016 a octubre de 2018 (Figura 18). De ellos, 45 (76,3%) fueron casos confirmados, 8 (13,6%) casos posibles y 6 (10,2%) casos probables. Las características sociodemográficas de la subpoblación de pacientes de esta parte del trabajo se muestran en la Tabla 26 (Anexo 1. Material suplementario). De los 59 pacientes incluidos, 55 (93,2%) fueron tratados con ivermectina, 2 (3,4%) con albendazol, 1 (1,7%) con albendazol + mebendazol y 1 recibió tratamiento antihelmíntico, pero no se registró el fármaco.

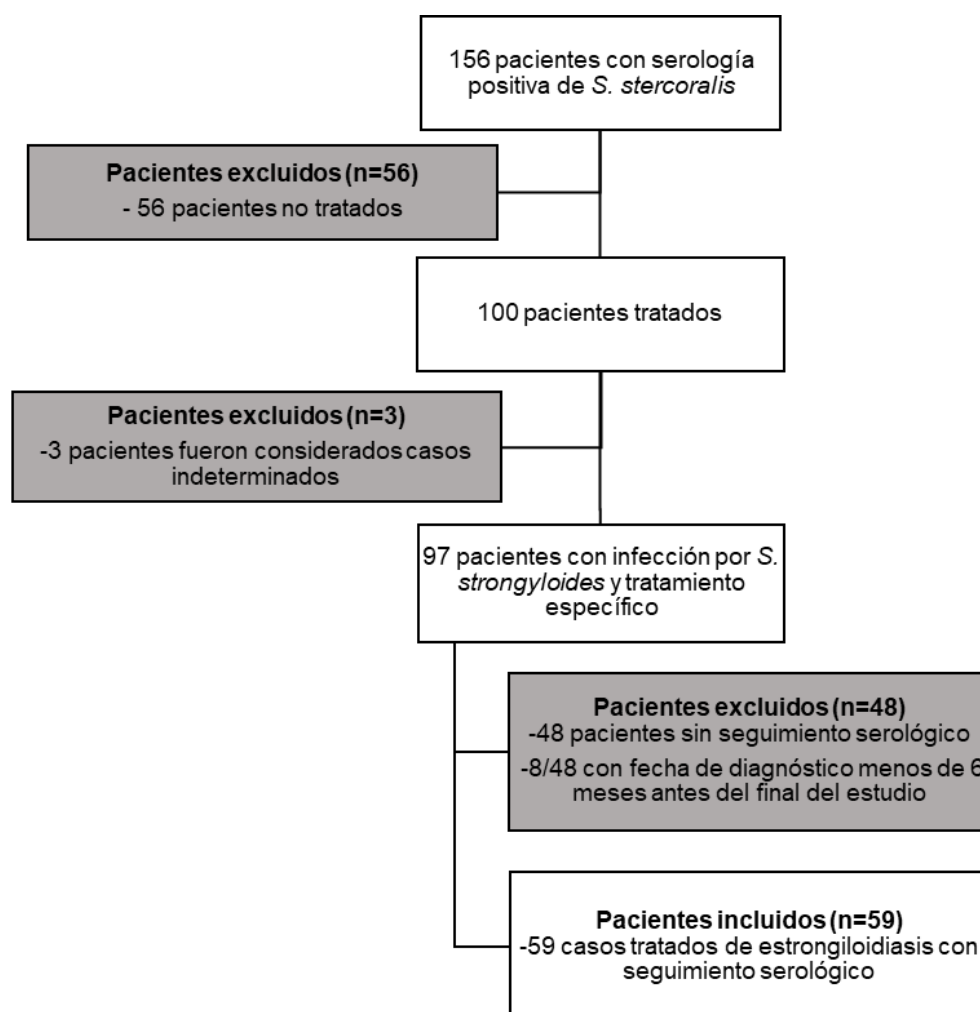


Figura 18. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo de seguimiento de estrongiloidiasis (N=59).

6.2.2. Número de muestras de seguimiento por paciente

De los 59 pacientes incluidos en el estudio, 30 (50,9%) tuvieron una sola muestra de suero de seguimiento, 19 (32,2%) tuvieron 2 muestras de seguimiento, 9 (15,3%) tuvieron 3 y 1 (1,7%) tuvo 4 sueros de seguimiento. La mediana de tiempo de seguimiento serológico fue de 8,8 meses (IQR: 5,8-13,0).

Con respecto al seguimiento con técnicas parasitológicas, en 49 de los 59 pacientes se remitió alguna muestra de heces de seguimiento (83,1%) y en 10 (17,2%) no se remitió ninguna. En 23 pacientes se remitió una muestra (39,0%), 17 (28,8%) tuvieron 2, 8 (13,6%) tuvieron 3 y 1 (1,7%) tuvo 4. La mediana de tiempo de seguimiento parasitológico fue de 8,8 meses (IQR: 5,8-14,0).

En cuanto a los seguimientos analíticos, 1 (1,7%) paciente no tuvo ningún seguimiento, 17 de los 59 pacientes (28,8%) tuvieron 1 solo seguimiento, 27 (45,8%) tuvieron 2, 12 (20,3%) tuvieron 3 y 2 (3,4%) tuvieron 4 seguimientos. La mediana de tiempo de seguimiento analítico fue de 10,9 meses (IQR: 6,0-15,9).

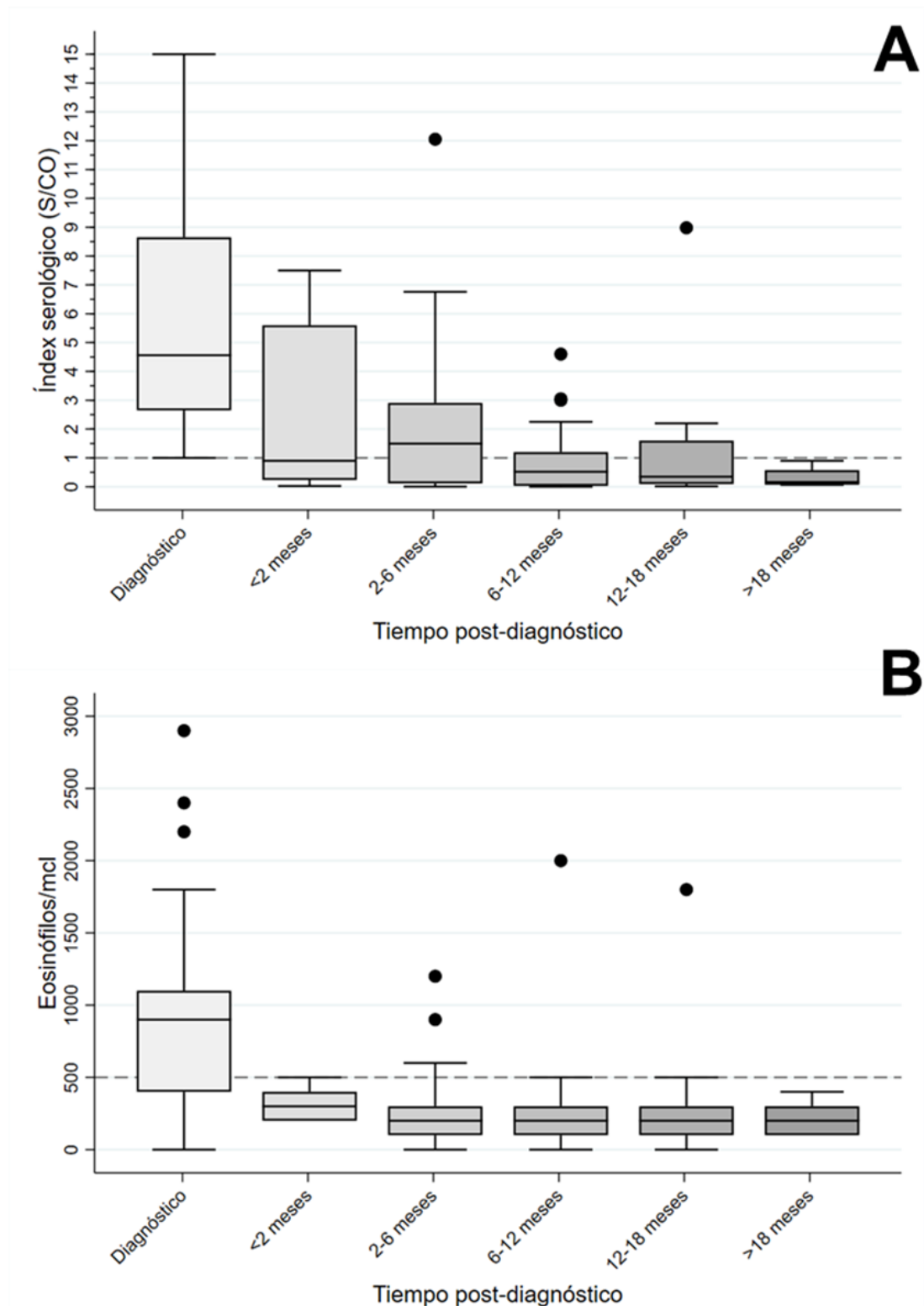
6.2.3. Evolución serológica y analítica de los pacientes tratados

En la Figura 19 se muestra la evolución de los índices serológicos (A) y del número de eosinófilos (B) según el periodo post-diagnóstico.

En cuanto al seguimiento serológico, en los 36 pacientes que tuvieron al menos una muestra en un periodo inferior a 6 meses, fue significativo el descenso del índice serológico con respecto al diagnóstico ($p<0,001$), negativizándose en 13/36 (36,1%) pacientes y cumpliendo criterios serológicos de cura el 77,8% de los pacientes (28/36) (Figura 20 A). En los 34 pacientes que tuvieron al menos una muestra en un periodo superior a los 6 meses post-diagnóstico, fue significativo el descenso del índice serológico con respecto al diagnóstico ($p<0,001$), negativizándose en 25/33 (72,7%) pacientes y cumpliendo criterios de cura el 88,2% de los pacientes (30/34) (Figura 20 B).

Respecto al seguimiento analítico, fue significativo el descenso del nivel de eosinófilos con respecto al diagnóstico en los 39 pacientes con determinación de eosinófilos en un periodo inferior a 6 meses ($p<0,001$), alcanzando cifras menores de 500 eosinófilos/ μ l el 89,7% de los pacientes (35/39) y cumpliendo criterios de cura analítica 37 de los 39 pacientes (94,9%) (Figura 21 A). En los 43 pacientes con al menos una determinación de eosinófilos en un periodo superior a 6 meses post-

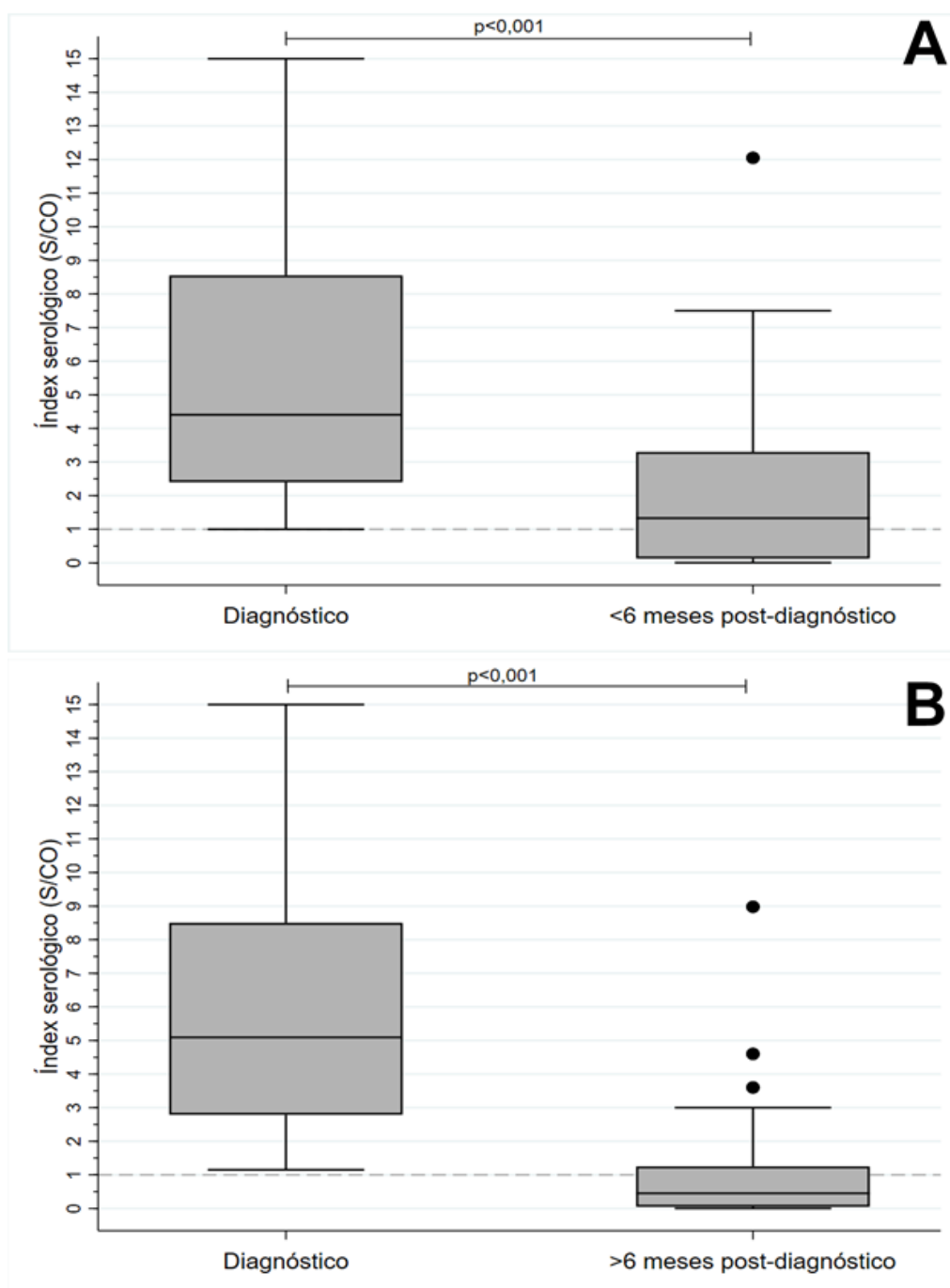
diagnóstico, fue significativo el descenso del nivel de eosinófilos con respecto al diagnóstico ($p<0,001$). En 39 de los 43 pacientes (90,7%), las cifras de eosinófilos fueron menores de 500 células/ μ l, cumpliendo los criterios de cura analítica 41 de los 43 pacientes (95,3%) (Figura 21 B).



A) La línea de puntos indica el punto de corte de la serología [Positivo: Índice (S/CO) ≥ 1].

B) La línea de puntos indica el nivel de eosinófilos considerado normal [Eosinofilia absoluta: > 500 eosinófilos/ μ L].

Figura 19. Evolución serológica (A) y analítica (B) de los pacientes con estrongiloidiasis tratada (N=58).

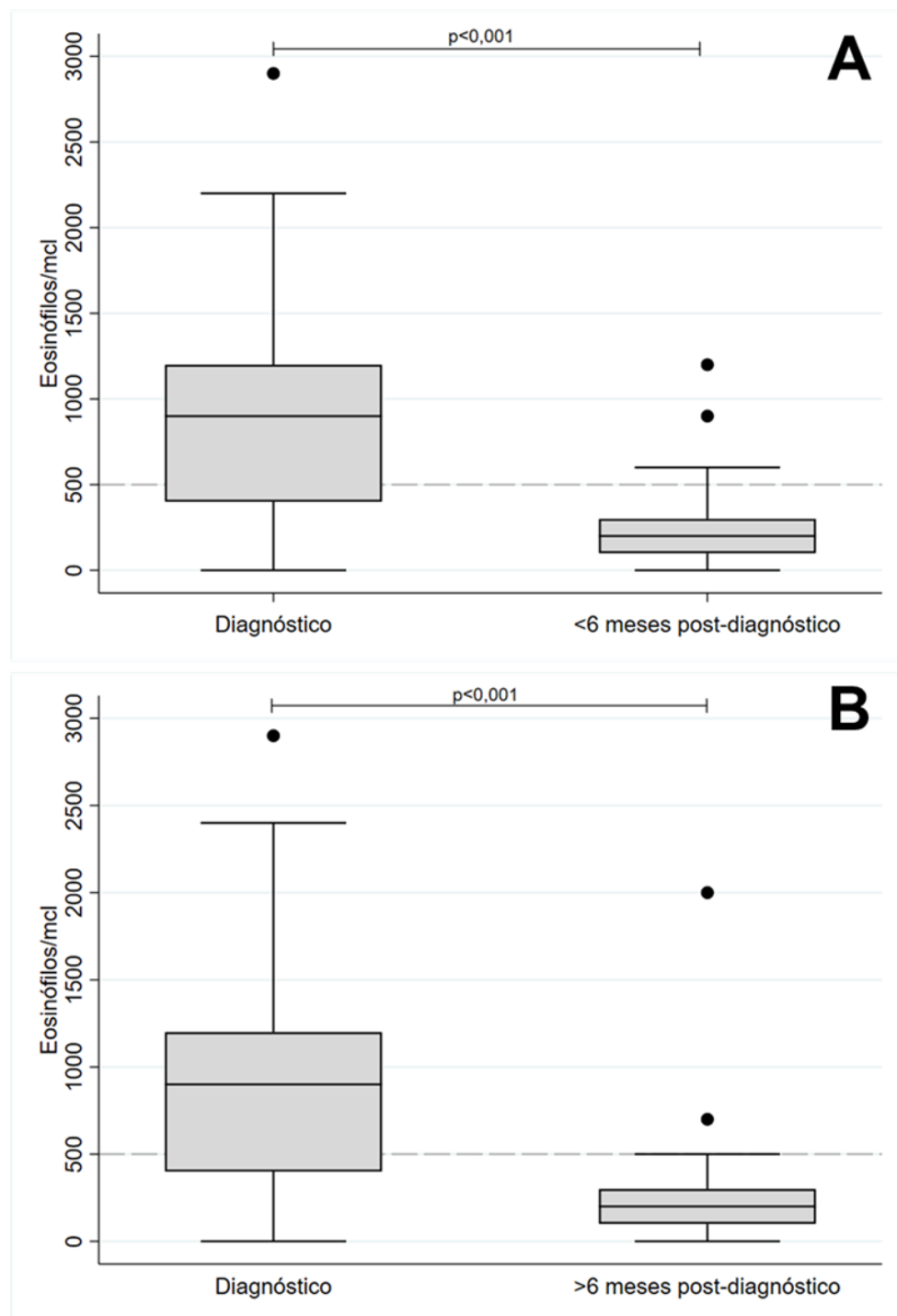


La línea de puntos indica el punto de corte de la serología [Positivo: Índice (S/CO) ≥ 1].

A) Mediana del índice serológico [S/CO] al diagnóstico: 4,4 (IQR: 2,4-8,6); mediana del índice serológico en la visita antes de 6 meses post-diagnóstico: 1,5 (IQR: 0,1-3,5), [n=36].

B) Mediana del índice serológico al diagnóstico 5,1 (IQR: 2,8-8,5); mediana del índice serológico en la visita después de los 6 meses post-diagnóstico: 0,5 (IQR: 0,1-1,0); [n=34].

Figura 20. Comparación de los índices serológicos al diagnóstico y antes (A) o después (B) de 6 meses post-diagnóstico.



La línea de puntos indica el nivel normal de eosinófilos [500 células/μl].

A) Mediana de eosinófilos [células/μl] al diagnóstico: 900 (IQR: 400-1200); mediana de eosinófilos en la visita antes de 6 meses post-diagnóstico: 200 (IQR: 100-300), [n=39].

B) Mediana de eosinófilos [células/μl] al diagnóstico: 900 (IQR: 400-1200); mediana de eosinófilos en la visita antes de 6 meses post-diagnóstico: 200 (IQR: 100-300), [n=43].

Figura 21. Comparación de los niveles de eosinófilos al diagnóstico y antes (A) o después (B) de 6 meses post-diagnóstico.

6.2.4. Análisis de los fracasos de tratamiento

En la Tabla 11 se muestran los pacientes evaluados según cada uno de los criterios preestablecidos y la proporción de pacientes que cumplen los criterios de cura y fracaso. Un total de 10 pacientes cumplieron criterios de fracaso según alguno de los criterios preestablecidos. Las características de estos pacientes se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11. Distribución de pacientes según los distintos criterios de cura.

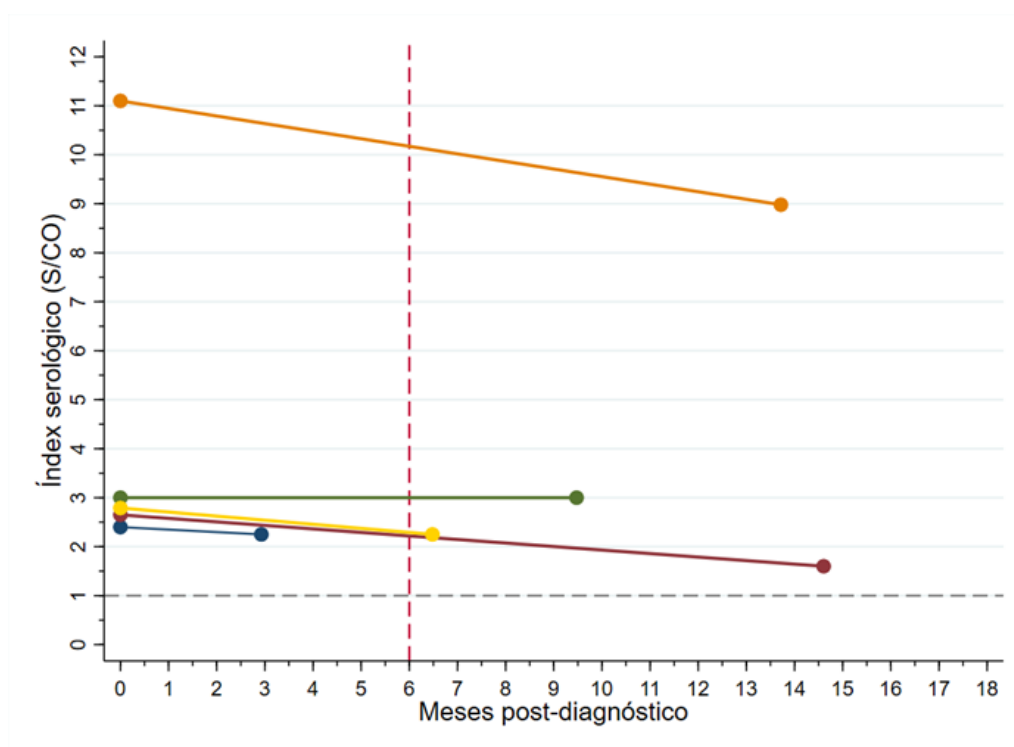
Criterio de cura	Pacientes evaluables	Cura (%)	Fracaso (%)
Técnicas serológicas	59	54 (91,5)	4 (8,5)
Técnicas parasitológicas	39*/48**	37/39 (94,9)	2/48 (4,2)
Criterios analíticos	45	38 (84,4)	7 (15,6)

* Casos confirmados con detección de larvas en heces y con alguna muestra de heces de seguimiento (i.e. evaluables para la cura parasitológica).

** Casos confirmados, probables y posibles que tuvieron alguna muestra de heces de seguimiento (i.e. evaluables para el fracaso parasitológico).

6.2.4.1. Fracasos de tratamiento según criterios serológicos

Los 5 pacientes que cumplieron criterios de fracaso de tratamiento por serología eran casos confirmados con detección de larvas en heces por técnicas parasitológicas. De ellos, 1 fue un *posible fracaso serológico* puesto que no tuvo seguimiento más allá de los 6 meses tras el diagnóstico (su última serología fue a los 3 meses post-diagnóstico y el índice había descendido de 2,4 a 2,25). Tres de los 5 pacientes se consideraron también fracasos analíticos, es decir, tenían eosinofilia en la última muestra de seguimiento analítico disponible. En uno de ellos se detectaron larvas de *S. stercoralis* en el seguimiento (*Fracaso parasitológico*). Tres de los 4 fueron pacientes no VIH en los que el tratamiento prescrito y administrado fue ivermectina, mientras que el otro fue un paciente VIH al que también se le prescribió ivermectina, pero finalmente tomó albendazol y mebendazol debido a que tenía serologías positivas de hidatidosis y cisticercosis (línea verde en la Figura 22).



La línea de puntos roja indica los 6 meses post-diagnóstico. El paciente representado con la línea verde es el que tomó albendazol + mebendazol y el representado con la línea naranja es el que fue también fracaso parasitológico y analítico.

Figura 22. Evolución del índice de la serología de los 5 pacientes considerados fracaso serológico.

6.2.4.2. Fracazos de tratamiento según criterios parasitológicos

En 2 pacientes se detectaron larvas de *S. stercoralis* en las muestras de seguimiento, ambos tratados con ivermectina. Uno de ellos fue diagnosticado con APC y el otro con RT-PCR en heces. Este último positivizó el APC dos meses después del diagnóstico con RT-PCR, aunque no queda claro en la historia clínica si tomó el tratamiento tras el diagnóstico con PCR o tras la positivización del APC, por lo que se trata de un *fracaso parasitológico dudoso*. El otro *fracaso parasitológico* fue también *fracaso analítico y serológico* (línea naranja en la Figura 22). Ninguno de los dos fue VIH.

6.2.4.3. Fracazos de tratamiento según criterios analíticos

Siete pacientes cumplieron criterios de fracaso de tratamiento según sus niveles de eosinófilos. Tres de los 7 eran además fracasos por criterios serológicos y 1 de ellos fue también fracaso por criterios parasitológicos. Uno de los pacientes con fracaso por criterios analíticos y serológicos fue el paciente VIH que había sido tratado con albendazol + mebendazol. Los 6 pacientes restantes fueron tratados con ivermectina.

En 2 de los 7 pacientes se describió alguna causa alternativa de eosinofilia (asma y coinfección con otros helmintos). Dos solo tuvieron eosinofilia relativa en la última muestra del estudio.

Tabla 12. Resumen de los pacientes con fracaso de tratamiento según al menos un criterio (N=10).

Características socio-demográficas	Tipo de caso según diagnóstico	Síntomas	Tipo de fracaso			Tratamiento administrado	Inmunosupresión	Otra causa de eosinofilia	Observaciones
			Serológico	Parasitológico	Análítico				
♂ 45 años, latinoamericano	Confirmado (APC)	No	Si	Si	Si	Ivermectina	No	No	Resuelve eosinofilia en muestra posterior al estudio
♂ 80 años, latinoamericano	Confirmado (PCR)	No	No	Si (Dudoso)	No	Ivermectina	No	No	Fecha de tratamiento dudosa
♀ 39 años, latinoamericana	Confirmado (APC)	No	Si	No	NE*	Ivermectina	No	No	Chagas
♀ 43 años, africana	Confirmado (APC y VD)	No	Si (Posible)	NE*	Si	Ivermectina	No	No	Solo eosinofilia relativa en última vista
♀ 30 años, latinoamericana	Confirmado (APC)	Si (Gastrointestinal, cutánea y respiratoria)	Si	No	Si	Albendazol + mebendazol	Si (VIH)	Hidatidosis - Cisticercosis (serología)	Ecografía abdominal normal
♂ 40 años, latinoamericano	Confirmado (APC)	No	Si	No	No	Ivermectina	No	No	-
♂ 50 años, latinoamericano	Confirmado (APC)	No	No	No	Si	Ivermectina	No	No	Resuelve eosinofilia en muestra posterior al estudio
♂ 39 años, latinoamericano	Confirmado (APC y VD)	Si (Gastrointestinal)	No	No	Si	Ivermectina	No	Asma	Mantiene clínica gastrointestinal tras tratamiento - Coinfección con <i>Blastocystis</i> tratada con metronidazol - Resuelve eosinofilia en muestra posterior al estudio
♀ 42 años, latinoamericana	Probable	No	No	No	Si	Ivermectina	No	No	Chagas - Solo eosinofilia relativa en última vista
♂ 32 años, latinoamericano	Probable	No	No	NE*	Si	Ivermectina	Si (VIH)	No	Eosinofilia absoluta (1800 células/μl) en última vista

* No evaluable: sin eosinofilia absoluta o relativa al diagnóstico.

** No evaluable: sin muestras de heces de seguimiento.

6.3. Análisis de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *S. stercoralis* utilizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre

6.3.1. Análisis de técnicas diagnósticas de laboratorio en el periodo de estudio

De los 314 pacientes con alguna técnica diagnóstica de estrongiloidiasis positiva, se incluyeron 258 (82,2%) en esta parte del estudio (Figura 23). En 256 (99,2%) pacientes se realizó VD y en 216 (83,7%) se realizó APC.

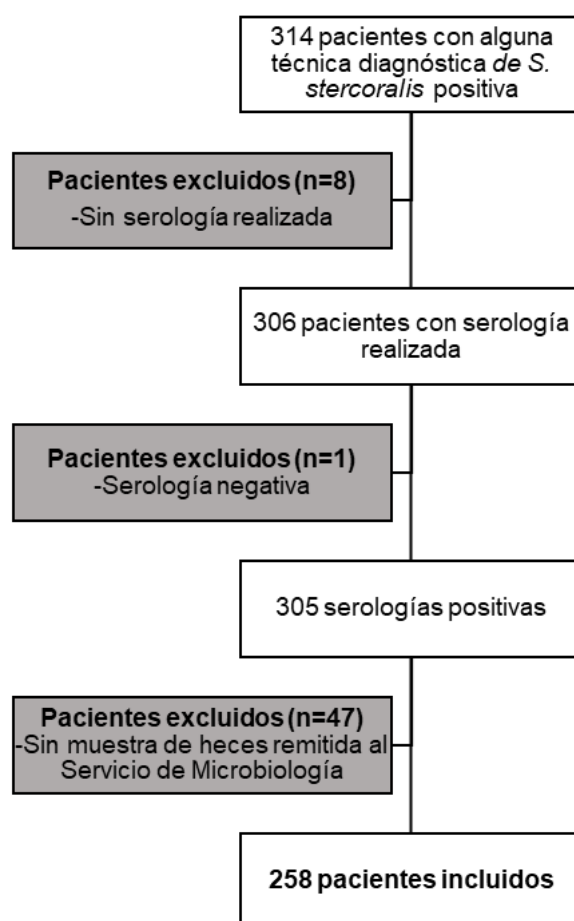


Figura 23. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el análisis de técnicas diagnósticas (N=258).

En el periodo de estudio se confirmaron 97 de los 258 (37,6%.) pacientes con serología positiva mediante detección de larvas en heces por cualquier técnica. Las tasas de detección globales por paciente de la VD, el APC y la RT-PCR fueron 7,8%, 31,9% y 31,6% respectivamente (Tabla 27, Anexo 1. Material suplementario). La tasa

de detección global por muestra de la VD fue 5,8% y la del APC 24,7% (Tabla 28, Anexo 1. Material suplementario). En el periodo total de estudio, la RT-PCR aumentó la proporción de casos confirmados en un 9,3% con respecto a los casos confirmados únicamente con técnicas parasitológicas (28,3%) (Tabla 13 y Figura 24).

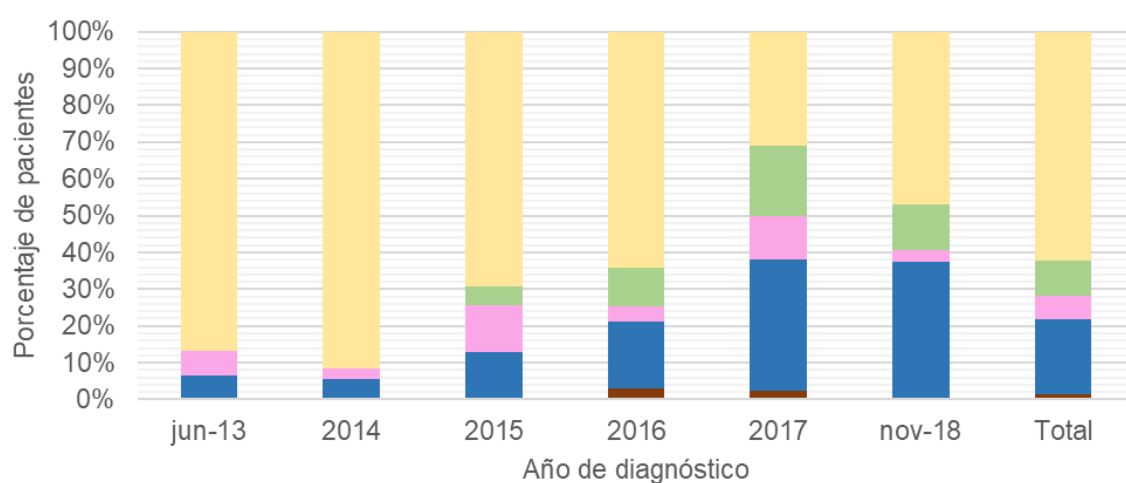
En cuanto al análisis por años, fue significativo el aumento en la proporción de casos confirmados entre 2014 y 2015 [8,6% (IC95%: 6,9-17,9) en 2014 vs. 30,8% (IC95%: 16,3-45,3) en 2015, $p=0,018$] y entre 2016 y 2017 [35,8% (IC95%: 26,2-45,4) en 2016 vs. 69,0% (IC95%: 55,0-83,0) en 2017, $p<0,001$].

El índice serológico fue más alto en los casos confirmados con técnicas parasitológicas que en los confirmados solo con RT-PCR [4,96 (IQR: 2,8-8,3) vs. 2,8 (IQR: 1,75-6,3), $p=0,026$] y que en los casos con RT-PCR negativa en heces [4,96 (IQR: 2,8-8,3) vs. 2,0 (IQR: 1,5-3,4), $p<0,001$]. Los casos confirmados con RT-PCR tuvieron índices serológicos mayores que los que tuvieron RT-PCR negativa [2,8 (IQR: 1,75-6,3) vs. 2,0 (IQR: 1,5-3,4), $p=0,070$], aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 25).

Con respecto a la comparación entre los periodos diagnósticos A y B, son significativos los aumentos en la proporción de pacientes con serología positiva y 3 o más muestras de heces remitidas para la realización de la VD ($p=0,010$) y del APC ($p<0,001$). También aumentó el porcentaje de pacientes con serología positiva y APC realizado ($p<0,001$), así como en el porcentaje de APC positivos ($p=0,018$). El número de peticiones de VD del concentrado de heces se mantuvo estable en los dos periodos de estudio, aunque la tasa de positividad aumentó de manera no significativa (4,1% en el periodo A vs 9,5% en el B, $p=0,262$). El porcentaje de serologías que se confirmaron con detección de larvas en heces aumentó del 10,0% en el periodo A al 62,2% en el periodo B ($p<0,001$) (Tabla 14).

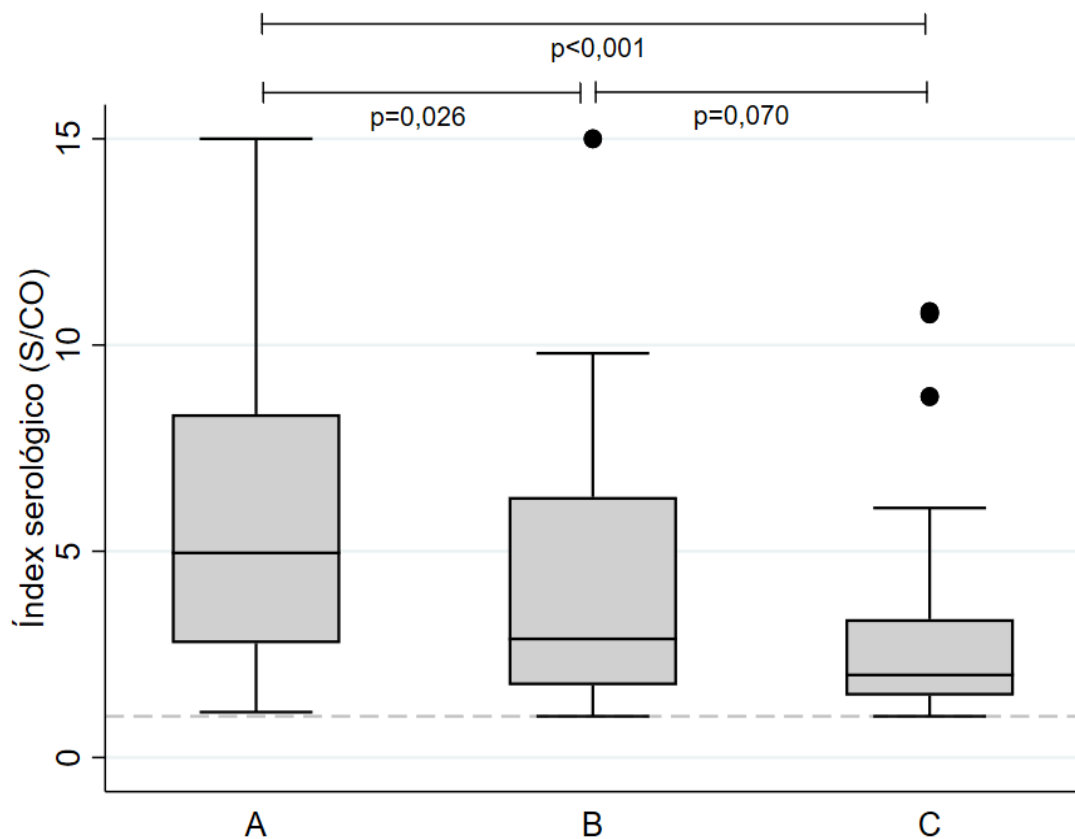
Tabla 13. Distribución de casos de estrongiloidiasis confirmados y no confirmados por año (N=258).

Número de pacientes por año	Jun-Dic 2013 n=15	2014 n=35	2015* n=39	2016 n=95	2017 n=42	Ene-Oct 2018 n=32	Total N=258
Casos confirmados con VD y/o APC, n (%)	2 (13,3)	3 (8,6)	10 (25,6)	24 (25,3)	21 (50,0)	13 (40,6)	73 (28,3)
Casos confirmados solo con RT-PCR, n (%)	0	0	2 (5,2)	10 (10,5)	8 (19,0)	4 (12,5)	24 (9,3)
Casos confirmados totales, n (%)	2 (13,3)	3 (8,6)	12 (30,7)	34 (35,8)	29 (69,0)	17 (53,1)	97 (37,6)



■ VD positiva ■ APC positivo ■ VD y APC positivos ■ RT-PCR positiva ■ No confirmados

Figura 24. Distribución de casos de estrongiloidiasis confirmados y no confirmados por año (N=258).



La línea de puntos indica el punto de corte de la serología [Positivo: Índice (S/CO) ≥ 1]. [A: casos confirmados con VD y/o APC (n=73); B: casos confirmados con RT-PCR (n=24); C: casos con RT-PCR negativa (n=53)].

Figura 25. Índice serológicos en función de la técnica de confirmación diagnóstica.

Tabla 14. Análisis comparativo de las técnicas diagnósticas parasitológicas y la proporción de casos confirmados en los periodos de estudio A y B.

Variable	Periodo A (Jun 2013-Dic 2014) [N=50]	Periodo B (Ene 2017-Oct 2018) [N=74]	P valor
Pacientes con 3 o más muestras de heces para VD remitidas % (IC95%)	60,0 (46,4-73,6)	81,0 (72,1-89,9)	0,010
Pacientes con 3 o más muestras de heces para APC remitidas % (IC95%)	18,0 (7,3-28,6)	76,0 (66,3-85,7)	<0,001
Pacientes con VD realizada % (IC95%)	98,0 (89,5-99,6)	98,6 (92,7-99,8)	0,642
Pacientes con VD positiva % (IC95%)	4,1 (1,1-13,7)	9,5 (4,7-18,5)	0,262
Pacientes con APC realizados % (IC95%)	58,0 (44,2-70,6)	93,2 (85,1-97,0)	<0,001
Pacientes con APC positivos % (IC95%)	17,2 (7,5-34,5)	47,8 (36,5-59,4)	0,045
Proporción de casos confirmados % (IC95%)	10,0 (1,6-18,3)	62,2 (51,1-73,2)	<0,001

6.3.2. Análisis comparativo de dos técnicas serológicas comerciales para el diagnóstico de *S. stercoralis*

Esta parte del trabajo fue publicada como artículo en la revista *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (Ver Anexo 2. Producción científica, A2.2. Artículos publicados)

En el estudio se analizaron un total de 249 muestras de suero de 233 pacientes, de las cuales 212 (85,1%) fueron concordantes y 37 (14,9%) discordantes. La distribución de muestras según esta clasificación se muestra en la Tabla 15. El coeficiente Kappa de concordancia entre técnicas fue 0,735 (0,647-0,822).

Tabla 15. Distribución de las muestras (diagnósticas y de seguimiento) según concordancia (N=249).

Muestras concordantes, n(%)		Muestras discordantes, n(%)			
Concordancia positiva	Concordancia negativa	Discordancias mayores		Discordancias menores	
		CrAg-ELISA Positivo/NIE-ELISA Negativo	CrAg-ELISA Negativo/NIE-ELISA Positivo	CrAg-ELISA Negativo/NIE-ELISA Equívoco	CrAg-ELISA Positivo/NIE-ELISA Equívoco
76 (30,5)	136 (54,6)	25 (10,0)	4 (1,6)	6 (2,4)	2 (0,8)

Los isotipos se realizaron en 32 de las 37 muestras discordantes. Solo cuatro fueron positivos para IgG1, todos ellos positivos con CrAg-ELISA y negativos con NIE-ELISA (discordancias mayores). Ninguna de las 32 muestras analizadas fue positiva para IgG4. De las 28 muestras que fueron negativas para IgG1 e IgG4, 17 fueron CrAg-ELISA+ (rango de los índices: 1,00-5,70)/NIE-ELISA-, 1 fue CrAg-ELISA+ (índice: 1,00)/NIE-ELISA equívoco (índice: 0,93), 6 fueron CrAg-ELISA- (rango de los índices: 0-0,82)/NIE-ELISA equívoco (rango de los índices: 0,91-1,06) y 4 fueron CrAg-ELISA-/NIE-ELISA+ (rango de los índices: 1,70-2,79).

De las 249 muestras, 26 fueron de seguimiento, por lo que se excluyeron de los siguientes análisis. Se incluyeron 223 muestras serológicas diagnósticas. Se evaluaron 66 pacientes (29,6%) con el gold-estándar primario y 223 (100,0%) con el gold-estándar compuesto. Según el gold-estándar compuesto, 83 (37,2%) se consideraron infectados (19/83 fueron verdaderos positivos con el gold-estándar primario) y 140 (62,8%) fueron pacientes no infectados (47/140 fueron verdaderos negativos con el gold-estándar primario) (Figura 26).

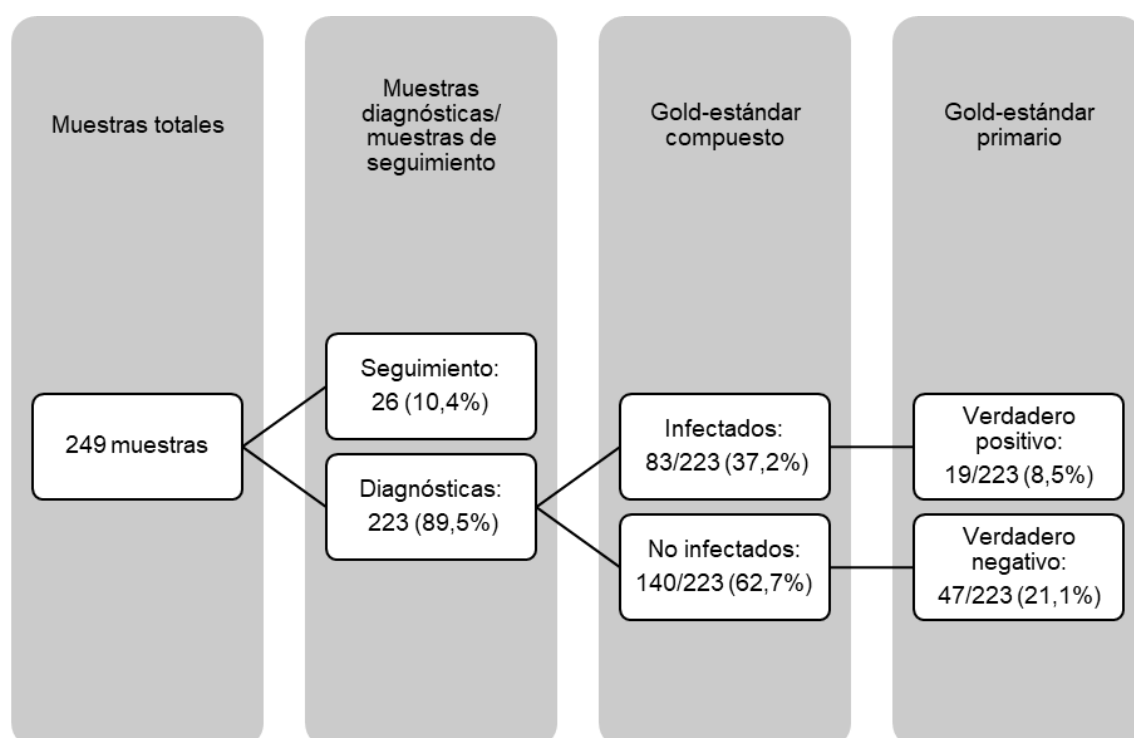


Figura 26. Clasificación de las muestras según los gold-estándar predefinidos.

En 177 de los 223 pacientes (79,4%) con muestras diagnósticas, se realizaron técnicas parasitológicas. En todos ellos se realizó VD (79,4%), APC en 132 (59,2%) y RT-PCR en 22 (9,9%) de los casos. Las pruebas parasitológicas fueron positivas en 5/177 (3,8%) con VD y 13/132 (9,8%) con APC. En 6 de los 22 (27,3%) pacientes con RT-PCR realizada, esta fue positiva.

De los 19 casos con detección de larvas en heces (verdaderos positivos con el gold-estándar primario), 14 fueron positivos con pruebas parasitológicas (8 solo con APC+, 1 solo con VD+, 4 con APC+/VD+, 1 con APC+/RT-PCR+) y 5 fueron detectados sólo con métodos moleculares. Tres de estos 5 pacientes con RT-PCR positiva en heces fueron discordancias mayores en serología (resultado positivo con CrAg-ELISA y resultado negativo con NIE-ELISA). En estos 3 pacientes, los isotipos IgG1 e IgG4 fueron negativos.

La clasificación de los resultados obtenidos con ambas técnicas comerciales con respecto a los gold-estándar preestablecidos se muestra en la Tabla 16.

Los valores de sensibilidad y especificidad calculados con los puntos de corte recomendados por el fabricante para las dos pruebas comerciales se muestran en la Tabla 17.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica para puntos de corte diferentes a los propuestos por el fabricante se muestran en la Tabla 30 (Anexo 1. Material suplementario). Los puntos de corte óptimos para el CrAg-ELISA fueron 3,55 y 1,00 utilizando el gold-estándar primario y compuesto, respectivamente. Los puntos de corte óptimos para NIE-ELISA fueron 2,10 y 0,76 utilizando el gold-estándar primario y compuesto, respectivamente. Las curvas ROC se muestran en la Figura 30, Figura 31, Figura 32 y Figura 33 (Anexo 1. Material suplementario).

Los valores predictivos para diferentes niveles de prevalencia se muestran en la Tabla 30 (Anexo 1. Material suplementario).

Tabla 16. Clasificación de los resultados (muestras diagnósticas) según los gold-estándar primario y compuesto (N=223).

Resultados de los tests comerciales		Gold-estándar primario			Gold-estándar compuesto		
		Verdadero positivo	Verdadero negativo	Total	Infectado	No infectado	Total
CrAg-ELISA	Positivo	18	13	31	74	15	89
	Negativo	1	34	35	9	125	134
	Total	19	47	66	83	140	223
NIE-ELISA*	Positivo	15	7	22	60	9	69
	Negativo	4	40	44	23	131	154
	Total	19	47	66	83	140	223

Tabla 17. Sensibilidad, especificidad e índice Kappa de las dos técnicas comerciales evaluadas según los gold-estándar primario y compuesto (N=223).

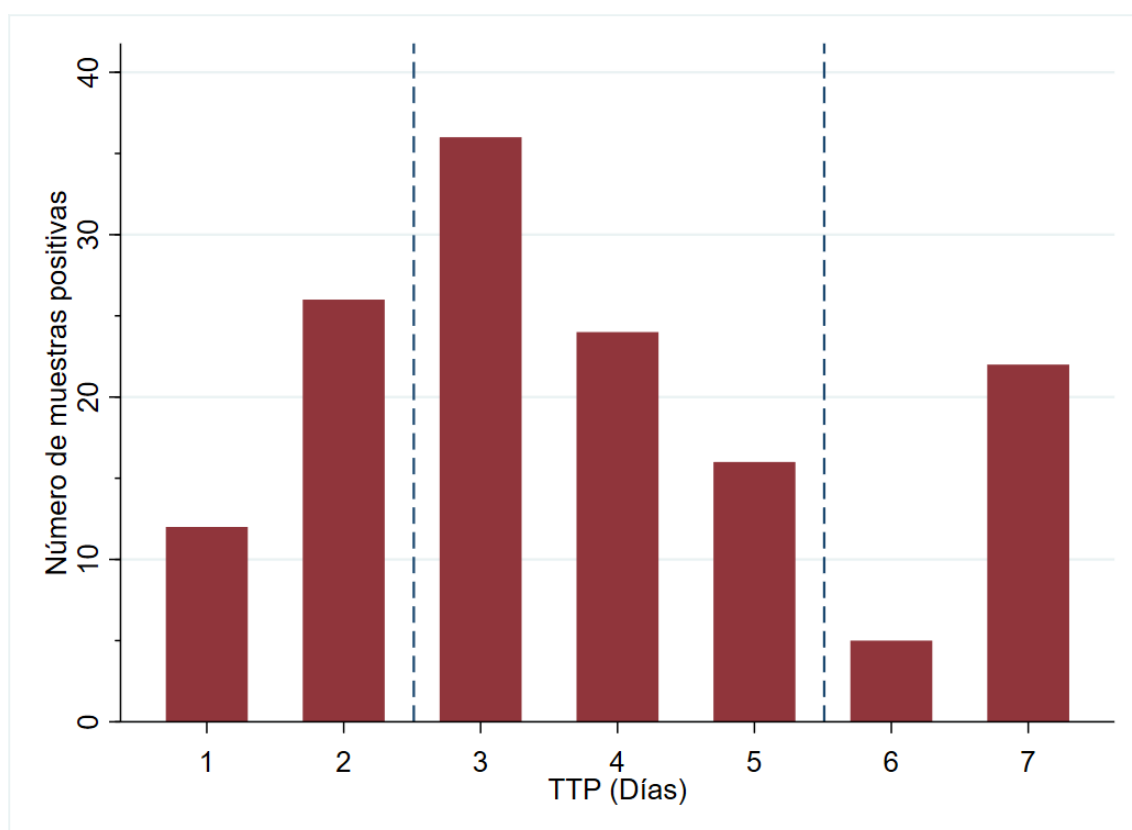
	CrAg-ELISA (Gold-estándar primario)	CrAg-ELISA (Gold-estándar compuesto)	NIE-ELISA (Gold-estándar primario)	NIE-ELISA (Gold-estándar compuesto)
Sensibilidad % (IC95%)	94,7 (75,4-99,0)	89,2 (80,7-94,2)	78,9 (56,7-91,5)	72,3 (61,8-80,8)
Especificidad % (IC95%)	72,3 (58,2-83,1)	89,3 (83,1-93,4)	85,1 (72,3-92,6)	93,6 (88,2-96,6)
Índice Kappa (IC95%)	0,565 (0,362-0,767)	0,773 (0,687-0,859)	0,612 (0,402-0,821)	0,682 (0,580-0,784)

6.3.3. Análisis del tiempo que tarda en positivizar (TTP) el agar-cultivo en el periodo de estudio

Se estudiaron un total de 141 muestras pertenecientes a 75 pacientes. De estos, 40 (53,3%) fueron hombres y la mediana de edad al diagnóstico fue 44,5 años (IQR: 36,1-53,8). El 96,0% de los pacientes fueron inmigrantes, siendo la mayoría de origen latinoamericano (82,7%). La mediana de tiempo en España hasta el diagnóstico fue 12,9 años (IQR: 8,9-15,7) y 37 de los 75 (49,3%) pacientes tuvieron algún síntoma atribuible a la estrongiloidiasis, siendo los síntomas gastrointestinales los mayoritarios (23/37), seguidos de los dermatológicos (19/37). El 92,0% tuvo eosinofilia absoluta o relativa. Las características demográficas, clínicas y analíticas adicionales de la población incluida en esta parte del trabajo se muestran en la Tabla 31 (Anexo 1. Material suplementario).

De las 141 muestras, en 38 (27,0%) pertenecientes a 23 pacientes (30,7%), el TTP fue menor o igual a 2 días y en 114 (80,9%) pertenecientes a 60 pacientes (80,0%), el TTP fue menor o igual a 6 días. En 27 (19,1%) muestras pertenecientes a 15 pacientes (20,0%), las larvas se detectaron entre el sexto y séptimo día (Tabla 18 y Figura 27).

En cuanto al análisis univariante, los pacientes con TTP medio menor de 3 días fueron más sintomáticos (73,3% vs. 43,3%, $p=0,047$). La edad, el género, el origen latinoamericano, los niveles de eosinófilos y los índices serológicos del ELISA SciMedx® no se asociaron con TTPs menores de 3 días (Tabla 31, Anexo 1. Material suplementario).



1ª línea de puntos: 38 (27,0%) muestras de 23 (30,7%) pacientes con TTP <3; 2ª línea de puntos: 114 (80,9%) muestras de 60 (80,0%) pacientes con TTP <6.

Figura 27. Distribución de muestras de heces en función del TTP (N=141).

Tabla 18. Distribución de pacientes (N=75) y muestras (N=141) según TTP.

TTP (Días)	Frecuencia por paciente, primer TTP (%) (N=75)	Frecuencia acumulada por paciente, primer TTP (%) (N=75)	Frecuencia por muestra (%) (N=141)	Frecuencia acumulada por muestra (%) (N=141)
1	7 (9,3)	7 (9,3)	12 (8,5)	12 (8,5)
2	16 (21,3)	23 (30,6)	26 (18,4)	38 (26,9)
3	21 (28,0)	44 (58,6)	36 (25,5)	74 (52,4)
4	13 (17,3)	57 (75,9)	24 (17,0)	98 (69,4)
5	5 (6,7)	62 (82,6)	16 (11,3)	114 (80,7)
6	4 (5,3)	66 (87,9)	5 (3,6)	119 (84,3)
7	9 (12,0)	75 (100,0)	22 (15,6)	141 (100,0)

7. Discusión

7.1. Incidencia de estrongiloidiasis y características sociodemográficas de la población atendida

En el presente trabajo se describe la tercera cohorte de casos de estrongiloidiasis más amplia en nuestro país, y la segunda si se tienen en cuenta los estudios realizados en un solo centro (119,120). El número total de pacientes diagnosticados fue superior a otros estudios españoles realizados en un periodo de tiempo similar (10,11). Esto podría ser consecuencia, por una parte, de la combinación de métodos serológicos y parasitológicos y, por otra, de la introducción de las técnicas moleculares en la rutina diagnóstica. Además, el método de clasificación de los pacientes (casos confirmados, probables y posibles), en el que se han tenido en cuenta factores de riesgo y eosinofilia, podría también influir en este aspecto. A falta de una buena técnica de confirmación diagnóstica, la combinación de resultados parasitológicos, serológicos y analíticos y la evaluación de los factores de riesgo epidemiológico proporcionan una perspectiva más completa de la estrongiloidiasis y permite realizar comparaciones entre los distintos grupos de pacientes, así como evaluar los factores asociados a cada grupo.

Con respecto a la incidencia de casos de estrongiloidiasis, se describen cifras superiores a las expuestas en otros estudios realizados en nuestro país (11,121). La tasa de incidencia media en la población general fue 10 casos por 100.000 habitantes/año, y hasta 76 casos por 100.000 habitantes/año si se considera solo la población inmigrante de área endémica. Llama la atención el aumento puntual de la incidencia en el año 2016. Aunque este incremento se observa también si se tienen en cuenta solo los casos confirmados con detección de larvas en heces, no se puede descartar que esta cifra se haya sobreestimado debido a la falta de especificidad de la técnica serológica de rutina, algo que, como se discutirá más adelante, se ha intentado mejorar a lo largo del periodo de estudio.

La mayor parte de los pacientes fueron inmigrantes de origen latinoamericano, principalmente procedentes de Ecuador, a diferencia de lo descrito en otras series en nuestro país. En estos estudios, realizados en otra zona de la Comunidad de Madrid y en el sur de España, se describe un mayor porcentaje de africanos (10,119), lo cual

probablemente sea consecuencia de las diferencias en la composición de la población atendida. En el presente trabajo, aproximadamente el 65% de los inmigrantes empadronados en el área de estudio eran latinoamericanos. Además, de manera análoga a la ya descrita relación entre el origen ecuatoriano y la estrongiloidiasis (122), se describe la asociación entre el origen latinoamericano y la detección de larvas en heces.

Los viajeros representaron menos del 5% de los casos de estrongiloidiasis, a diferencia de lo expuesto por Ramírez-Olivencia et. al (10). Este autor describe que hasta un tercio de las infecciones por *S. stercoralis* se producen en viajeros. El método de clasificación de los pacientes podría estar relacionado con la baja proporción de viajeros en la cohorte, ya que en 24 de los 38 casos considerados indeterminados no se disponía de información acerca de factores de riesgo epidemiológico. De igual forma, aunque se asumiera que esos 24 pacientes finalmente fueran viajeros, el porcentaje sería del 12,3%. Esta cifra, similar a la descrita en otro estudio realizado en nuestro país (11), puede deberse a que nuestro centro no dispone de consulta específica de atención al viajero (10). Por tanto, el porcentaje real de viajeros con estrongiloidiasis en el área de estudio probablemente sea mayor que lo descrito en este trabajo.

La mediana del tiempo de estancia en España de los inmigrantes hasta el diagnóstico fue de 12 años, cifra mucho mayor que las descritas en la literatura (10,11,119). Esto podría deberse a un menor uso de la asistencia sanitaria de los inmigrantes atendidos en el área, a pesar de la cobertura universal del Sistema Nacional de Salud, así como al bajo índice de sospecha debido a que la mayoría de los pacientes son asintomáticos. Es necesaria la implantación de protocolos universales de *screening* del inmigrante asintomático, puesto que en infecciones como esta, en la que la clínica a menudo es leve o inexistente, el diagnóstico microbiológico es indispensable para detectar y tratar al máximo número de pacientes, evitando así las posibles complicaciones de la infección (104).

El 20% de los casos de estrongiloidiasis fueron pacientes con algún tipo de inmunosupresión, siendo el VIH la principal causa (el 12% de los pacientes fueron VIH positivos), lo cual es un porcentaje mayor que el descrito en otros estudios (10,11). La existencia en nuestro centro de una consulta de Medicina Interna/Infecciosas especializada en el seguimiento de los pacientes con VIH, en la cual sí que aplica sistemáticamente un protocolo de *screening* del inmigrante (123), así como las

características propias de la población atendida, son los factores que podrían justificar este alto porcentaje de población VIH.

De los 276 pacientes incluidos en el estudio, se realizó el cribado de HTLV-1 a 155, diagnosticándose solo un caso de coinfección, es decir, la prevalencia fue de 0,4%. A pesar de esta baja prevalencia, y contrariamente a lo que se expone en otro estudio (122), es recomendable la realización del cribado de HTLV-1 en pacientes con una infección por *Strongyloides* diagnosticado por serología y/o con confirmación en heces, debido a las posibles complicaciones que puede conllevar la coinfección.

El 13,0% de los pacientes latinoamericanos diagnosticados de estrongiloidiasis tenía además enfermedad de Chagas, de manera similar a lo descrito por Ramírez-Olivencia (10). Conviene destacar que en 62 de los 213 pacientes latinoamericanos no se realizó serología de *T. cruzi*, por lo que probablemente la seroprevalencia real de la coinfección *Strongyloides-T. cruzi* sea superior a lo descrito. Como era de esperar, la mayoría de los pacientes coinfectados eran originarios de Bolivia, país donde la prevalencia de enfermedad de Chagas es mayor (124). Recientemente se ha establecido la correlación entre la infección *S. stercoralis* y *T. cruzi*, más allá de los factores de riesgo epidemiológico comunes. Por una parte, se ha descrito que la infección por *Strongyloides* aumenta la probabilidad de tener una PCR positiva de *T. cruzi* en sangre periférica (106). En el presente estudio, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa, se observó un porcentaje mayor de pacientes con PCR positiva en el grupo de los confirmados en comparación con el de los no confirmados, así como una mayor proporción de PCRs positivas en pacientes con síntomas relacionados con la estrongiloidiasis en comparación con los asintomáticos. Asimismo, se ha demostrado que los pacientes con infección por *T. cruzi* tienen una mayor probabilidad de tener una serología positiva de *S. stercoralis*, independientemente de los factores de riesgo epidemiológico asociados a vivir en área rural (109). Aunque no se analizó este aspecto debido al bajo número de pacientes coinfectados, actualmente se está llevando a cabo un análisis de la cohorte de casos con enfermedad de Chagas atendida en nuestro centro, para establecer qué variables además de la estrongiloidiasis pueden estar relacionadas con la detección de *T. cruzi* en sangre.

Se ha detectado una importante proporción de serologías positivas de otras enfermedades parasitarias. Destacan la hidatidosis y la cisticercosis, las cuales se dieron en un mayor número de pacientes. Estas infecciones parasitarias comparten áreas de endemidad con la estrongiloidiasis, por lo que se podría tratar de

coinfecciones verdaderas (125,126). No se debe olvidar que, al igual que ocurre con la estrongiloidiasis, no existe un buen gold-estándar diagnóstico para infecciones como las ya citadas hidatidosis y cisticercosis, o para otras como la toxocariasis (de la cual se describe un número importante de pacientes seropositivos), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que se trate de reactividades cruzadas (81).

En cuanto a los casos indeterminados, se decidió excluir a esta población del análisis general, ya que el valor predictivo positivo de las técnicas serológicas en poblaciones de baja prevalencia de la infección es muy bajo (127). Además, algunos autores definen como “autóctonos” casos solo diagnosticados por serología, algo que, en ausencia de factores de riesgo epidemiológico, se debería analizar cuidadosamente, especialmente si, además de la ausencia de factores de riesgo, existen reactividades cruzadas serológicas/coinfecciones con otros parásitos de más amplia distribución como el ya citado *Toxocara* spp. (17). Teniendo en cuenta que los estudios realizados en España describen altas prevalencias en una zona muy concreta de la península y asociadas a las actividades agrícolas, se consideró que estas serologías eran probables falsas reactividades (19). Además, en una reciente revisión realizada en nuestro país, la mayoría de los casos autóctonos diagnosticados en zonas diferentes a la Costa Mediterránea eran pacientes de mayor edad que los aquí descritos (18). Esto podría justificarse porque quizá en la juventud realizaran actividades de riesgo como caminar descalzos o trabajar en la agricultura en zonas de nuestro país en las que sí había transmisión del parásito y que, en la actualidad, gracias a la mejora en la higiene y en las condiciones sanitarias, se haya disminuido o eliminado esta transmisión (128). En el caso de los dos pacientes españoles sin factores de riesgo epidemiológico, con serología positiva y RT-PCR positiva en heces, aunque no se puede descartar que se trate de verdaderos casos autóctonos, la ausencia de eosinofilia y la decisión de no prescribir tratamiento específico por los clínicos, plantea la posibilidad de que se trate de falsos positivos de la RT-PCR o de contaminaciones cruzadas. Por ello, estos dos pacientes se excluyeron de la cohorte principal de estudio.

Los pacientes con visualización de larvas en heces presentaron más comorbilidades que los casos probables y posibles, siendo el alcoholismo la principal. Además, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, la proporción de pacientes alcohólicos fue mayor en el grupo de los casos confirmados que en el de los que solo tenían serología positiva. Estos resultados confirmarían lo descrito por Marques C. et al, autora que establece una relación directa entre el número de larvas

detectadas en heces y el nivel de alcoholismo (113). De esta manera, aunque no fue posible cuantificar ni el nivel de alcoholismo ni la carga parasitaria en heces, una mayor carga intestinal del parásito en los pacientes alcohólicos podría favorecer la mayor detección de larvas en heces y, por tanto, la confirmación diagnóstica en este grupo de pacientes.

7.2. Síntomas relacionados con la infección por *S. stercoralis*

Al igual que lo descrito en la literatura, algo más de la mitad de los pacientes fueron asintomáticos (10,11). Los síntomas mayoritarios fueron los cutáneos, y en concreto la urticaria, a diferencia de otros estudios en los que la clínica abdominal es la predominante (11,119,129,130). Esto puede estar influido por los criterios diagnósticos de laboratorio, puesto que, en muchos estudios, principalmente en los realizados en áreas endémicas, solo se incluyen pacientes con detección de larvas en heces por técnicas parasitológicas. Esto se debe a que, en algunos casos, existe una menor disponibilidad de técnicas serológicas comerciales, especialmente en zonas de recursos limitados y, en otros casos, a la realización de la serología solo en pacientes seleccionados. Por otra parte, la clínica gastrointestinal se asoció significativamente con la confirmación del parásito en heces. Como ya se ha expuesto en el apartado anterior, una mayor carga parasitaria intestinal podría favorecer la detección del parásito en heces y esto, a su vez, podría estar relacionado con la sintomatología digestiva, aunque debido a que las técnicas parasitológicas utilizadas en el presente estudio no son cuantitativas, no se puede demostrar la asociación directa entre el nivel de larvas en heces y los síntomas. Hasta la fecha, solo un estudio ha descrito la asociación entre carga parasitaria y clínica, no obstante, fue la urticaria el síntoma que se asoció a mayor carga parasitaria (129). Con respecto a los factores relacionados con los síntomas de estrongiloidiasis, ser inmigrante se asoció negativamente, lo cual sugiere que, a pesar del escaso número en pacientes no inmigrantes incluidos en este estudio, los viajeros tendrían una mayor probabilidad de presentar síntomas, tal y como describen otros autores (75).

La eosinofilia fue el motivo de consulta principal y, aunque estuvo presente en el 16% de los casos confirmados y en la mitad de los no confirmados, los niveles de eosinófilos fueron normales en casi el 40% de los pacientes, cifra similar a la descrita en otras series (131). Es destacable que el perfil de la eosinofilia producida por este parásito es fluctuante y depende del momento del ciclo biológico (132). A pesar de que

la infección por *S. stercoralis* se ha definido como la principal causa de eosinofilia importada en nuestro país, describiéndose cifras alrededor del 30% en el caso de los inmigrantes subsaharianos y hasta el 70% en los latinoamericanos (133,134), hay que destacar que la ausencia de esta alteración analítica no descarta la infección. Por otra parte, la inmunosupresión se asoció a menores niveles de eosinófilos, así como a la ausencia de síntomas de estrongiloidiasis. Esto podría deberse a dos razones: por un lado, el *screening* en estos pacientes se realiza de manera sistemática aunque no presenten clínica atribuible al parásito o alteraciones analíticas, debido al riesgo que tienen de desarrollar cuadros graves, por lo que es probable que exista una mayor proporción de inmigrantes inmunosuprimidos con cribado de estrongiloidiasis en comparación con los inmigrantes inmunocompetentes; por otro lado, los niveles de eosinófilos en los pacientes que están en tratamiento con corticoides posiblemente sean más bajos debido al propio efecto del fármaco (135). Además, se han descrito niveles menores de eosinófilos en casos de estrongiloidiasis en pacientes con defectos de la inmunidad celular como el VIH y el HTLV-1 (103,136,137). Por último, al igual que se describe en otros estudios, la eosinofilia, y especialmente la moderada-grave, fueron las variables que se asociaron con mayor fuerza a la detección del parásito en heces, (120,132).

En cuanto a la IgE total, aunque solo se determinó en 59 de los 276 pacientes, se observaron niveles más altos en pacientes asintomáticos, algo que se podría explicar por el papel que tiene esta inmunoglobulina en el control de la infección. Como se ha descrito en la literatura, pacientes con alteraciones de la inmunidad como el HTLV-1 y, por tanto, con niveles más bajos de IgE, tienen mayor riesgo de desarrollar cuadros severos de estrongiloidiasis (138,139). Otros autores han demostrado la asociación de niveles altos de IgE con una menor carga parasitaria en heces (140). Recientemente se ha descrito que, además de en los coinfectados con HTLV-1, en pacientes menores de 70 años y en mujeres, los niveles de IgE en los casos de infección por *S. stercoralis* pueden ser normales (138). Por ello, la IgE es un marcador muy variable e inespecífico, cuya utilidad en el diagnóstico de la estrongiloidiasis es limitada, por lo que solo debería solicitarse como prueba complementaria.

Hay que destacar que, en el periodo de estudio, no se detectó ningún síndrome de hiperinfección o infección diseminada. Uno de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* de foco desconocido podría estar causado por *S. stercoralis*, aunque en la historia clínica no lo reflejan como tal y, a pesar de que se detectó parásito en heces tanto con la visualización directa como con el cultivo, no se puede asegurar que se trate de una

verdadera hiperinfección o infección diseminada puesto que no se aislaron larvas en ninguna otra localización. En nuestro país, una reciente revisión de casos de infección severa por *S. stercoralis* define una baja prevalencia, describiéndose 18 casos en toda España en un período de 15 años (137). Un aspecto importante en este campo es que la mayoría de los casos de hiperinfección están descritos en inmigrantes residentes en países donde la endemicidad de la infección es baja, lo cual indica que en los países con alta prevalencia del parásito es posible que este síndrome esté infradiagnosticado (121,141).

En cuanto al tratamiento, la mayoría de los pacientes fueron tratados con ivermectina, fármaco de elección de la estrongiloidiasis, en dos dosis en días consecutivos o en semanas consecutivas. No se pudieron analizar las diferencias entre las dos pautas ya que en muchos casos este dato no se registró en la historia clínica, principalmente debido a la falta de seguimiento. En 76 de los 276 pacientes no se prescribió tratamiento, siendo 8 de ellos mujeres embarazadas (la ivermectina es un fármaco de categoría C (97), por lo que no se debe administrar en gestantes). Es probable que el alto porcentaje de pacientes no tratados que se describe en la cohorte se deba también a un sesgo en la recogida de datos, aunque no se puede descartar que se esté prescribiendo menos tratamiento por parte de los clínicos a los pacientes con una serología positiva aislada. Esto último estaría justificado, ya que existe una diferencia significativa entre el porcentaje de pacientes tratados con confirmación de larvas en heces y los tratados que habían sido diagnosticados solo con serología.

Los pacientes se diagnosticaron principalmente mediante serología, obteniéndose un rendimiento del 99,2%. Por tanto, como se describe en la literatura, la serología fue una herramienta indispensable en el diagnóstico de laboratorio de la estrongiloidiasis (73). Los índices serológicos altos se asociaron a la detección de larvas en heces, mientras que los índices bajos se asociaron a pacientes inmunodeprimidos, algo ya definido previamente (103). Asimismo, se detectó un falso negativo de la serología en un paciente con APC positivo. Este paciente era VIH y tenía una importante inmunosupresión (27 CD4). Aunque se ha demostrado la baja sensibilidad de la serología de *S. stercoralis* en pacientes inmunosuprimidos por causas distintas al VIH (142,143), algunos autores sugieren que esto también podría ocurrir en pacientes VIH, especialmente en los casos de hiperinfección (12,144). Por ello, y como se discutirá en el apartado 7.4.1 (Análisis de técnicas diagnósticas en el periodo de estudio), para realizar un adecuado *screening* de *S. stercoralis* es necesaria la combinación de técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares.

7.3. Seguimiento de los pacientes

Con respecto al seguimiento de laboratorio de los casos diagnosticados y tratados, el grupo de pacientes con seguimiento fue muy heterogéneo y la mitad de ellos no tuvo ninguna muestra de seguimiento serológico, por lo que el análisis estadístico de estos datos es limitado. A la vista de los resultados, el punto de corte clásicamente definido como cura por Kobayashi et al (101) podría acortarse, puesto que el 77% de los pacientes de la cohorte reducen el ratio DO seguimiento/DO diagnóstico por debajo de 0,6 o bien negativizan la serología antes de los 6 meses post-diagnóstico, algo similar a lo descrito por Loutfy et al. (102). Sin embargo, esto no descartaría tomar muestras de suero y heces posteriormente, ya que se han descrito fracasos de tratamiento incluso con detección de larvas en heces con métodos parasitológicos y/o moleculares pasado más de un año tras el tratamiento (145). No se pudo evaluar la eficacia de los distintos tratamientos y pautas por el escaso número de pacientes presente en cada grupo, así como por la heterogeneidad de los periodos de seguimiento, del número de muestras por paciente y de las técnicas de laboratorio realizadas. Por tanto, es necesario insistir en la aplicación del protocolo de seguimiento propuesto para poder analizar mejor la evolución de los pacientes atendidos en nuestro centro.

La bajada de los niveles de eosinófilos fue más rápida que el descenso de la serología de *Strongyloides*, normalizándose estos antes de los 6 meses en el 95% de los pacientes, al igual que lo descrito por otros autores (146,147). Sin embargo, como se ha detallado en el análisis individual de los fracasos de tratamiento, los niveles de eosinófilos pueden estar alterados por causas diferentes a la estrongiloidiasis. En dos de los pacientes que no resuelven la eosinofilia, otras infecciones parasitarias como la hidatidosis, o afecciones como el asma, podrían haber influido en el mantenimiento de la eosinofilia tras el tratamiento antiparasitario. Por otra parte, en algunos casos, aunque se normalicen los eosinófilos, se puede dar un fracaso de tratamiento por otros criterios (145). En el presente trabajo, dos pacientes con niveles de eosinófilos normales (uno de ellos sin eosinofilia en el diagnóstico y el otro con eosinofilia al diagnóstico y normalización de eosinófilos tras tratamiento) cumplieron criterios de fracaso serológico. Por tanto, la eosinofilia no se debería tener en cuenta como único marcador, sino como complemento a la serología y a las técnicas parasitológicas, ya que es menos específico que estas. Es necesaria la realización de estudios bien

diseñados que evalúen la evolución de los marcadores serológicos, parasitológicos y analíticos para poder establecer protocolos de seguimiento adecuados.

7.4. Técnicas diagnósticas de laboratorio

7.4.1. Análisis de técnicas diagnósticas en el periodo de estudio

En cuanto al análisis de las técnicas parasitológicas, como era de esperar, se obtuvo un rendimiento cuatro veces mayor del APC con respecto a la VD del concentrado (31,9% vs. 7,8%), algo repetidamente descrito en la literatura (73).

Existe una mayor proporción de pacientes con al menos tres muestras de heces remitidas al laboratorio en el periodo B de estudio, tanto con petición de VD como de APC. Al igual que describen otros autores, y como ocurre en el diagnóstico de otros parásitos intestinales, las tasas de detección, tanto de la VD como del APC, aumentan cuando se analizan tres muestras por paciente en vez de una, por lo que para realizar un adecuado diagnóstico parasitológico sería recomendable remitir al menos tres heces por paciente, preferiblemente en días no consecutivos (70,148).

También ha aumentado significativamente el número de peticiones de APC, realizándose en el 58,3% de los pacientes con serología positiva en el periodo A y en el 93,2% en el periodo B. Como ya se ha discutido, el diagnóstico de estrongiloidiasis se debería basar en la combinación de métodos diagnósticos serológicos y parasitológicos y, debido a la limitada utilidad de la VD en el caso de *S. stercoralis*, se debería optar por la técnica más sensible disponible en la cartera de servicios del laboratorio, en el caso de nuestro centro, el APC (73). El aumento del número de APCs realizados supone una mayor concienciación por parte del clínico, tanto de la importancia de un buen diagnóstico de *S. stercoralis* como de un mayor conocimiento de las técnicas de laboratorio más adecuadas para dicho diagnóstico y, en concreto, de las técnicas disponibles en el Servicio de Microbiología de nuestro centro.

Por otra parte, el porcentaje de positividad del APC ha sufrido también un aumento significativo en los dos periodos estudiados. Esto podría explicarse por la recomendación de mantener las muestras de heces a temperatura ambiente hasta su procesamiento, tanto desde el laboratorio de Microbiología al clínico como del clínico al propio paciente, ya que no se ha realizado ninguna otra modificación metodológica a lo largo del estudio. A pesar de estar ampliamente descrito en la literatura, la

conservación y procesamiento de las muestras es un factor limitante en la confirmación diagnóstica de *S. stercoralis*, por lo que es necesario insistir en la correcta recogida y preservación de las heces (66).

Asimismo, no se puede descartar la influencia de la mejora en la técnica de lavado del ELISA SciMedx® en la proporción de casos confirmados. Entre 2016 y 2017, se observó un aumento del porcentaje de casos con serología positiva y detección de larvas en heces, algo que podría explicarse no solo por lo expuesto anteriormente acerca del mayor número de solicitudes y el mayor rendimiento de las técnicas parasitológicas, sino también porque el número total de serologías positivas disminuyó en 2017, probablemente debido a este cambio en el sistema de lavado del ELISA SciMedx®.

La utilidad de la PCR en heces como técnica diagnóstica ha sido demostrada en la literatura, aunque los resultados son heterogéneos, obteniéndose sensibilidades menores a las técnicas parasitológicas convencionales en la mayoría de los estudios (90). En el caso concreto de la RT-PCR evaluada en este estudio, desarrollada y validada por Saugar et al. (88), se describe una sensibilidad de 93,8% y una especificidad de 86,5%, cifras muy superiores a lo anteriormente publicado. Esto es consecuencia de la concentración de las heces previa a la extracción del ADN. Sin embargo, un estudio epidemiológico en área endémica realizado por el mismo grupo describe una menor sensibilidad de esta RT-PCR, siendo positiva solo en aproximadamente un tercio de las muestras confirmadas con técnicas parasitológicas, aunque detectó un 38% adicional de casos que no habían sido diagnosticados con las técnicas convencionales. Aunque probablemente influyan el diseño del estudio y el tipo de pacientes evaluados, los autores concluyen que la mejor aproximación diagnóstica para *S. stercoralis* es la combinación de métodos parasitológicos y moleculares (149). Por esta razón, y en concordancia con otros trabajos, en el presente estudio la RT-PCR se utilizó como confirmación diagnóstica en pacientes con serología positiva y técnicas parasitológicas negativas (90). Repetto et al. proponen un algoritmo diagnóstico aplicable a pacientes con riesgo de desarrollar cuadros graves, en el que incluyen la PCR como segundo paso en caso de que las técnicas parasitológicas sean negativas (150). Aunque no incluyen la serología, es una aproximación similar a la propuesta en el presente trabajo, en la que la RT-PCR es utilizada como segunda prueba tras la realización de la VD y del APC. Sería interesante evaluar de manera prospectiva el algoritmo diagnóstico propuesto en distintas subpoblaciones de pacientes, clasificados según diferentes criterios: eosinofilia, factores de riesgo,

inmunosupresión, etc. Además, aunque el número de pacientes con RT-PCR positiva fue bajo y por lo tanto la diferencia no fue significativa, se obtuvieron índices serológicos más altos en comparación con los pacientes con RT-PCR negativa, por lo que se podría definir un punto de corte de la serología a partir del cual realizar la RT-PCR en heces. Esto podría ser objeto de futuros estudios.

En resumen, los datos presentados en este apartado demuestran que se ha producido una clara mejora en el diagnóstico de laboratorio de la infección por *S. stercoralis* en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Esta mejora es consecuencia de una aproximación multidisciplinar al diagnóstico de la estrongiloidiasis, en la cual están implicados tanto el Servicio de Microbiología como el propio clínico solicitante de las pruebas. Como consecuencia de los distintos cambios aplicados en la rutina asistencial, se ha conseguido aumentar en seis veces el porcentaje de pacientes con confirmación diagnóstica del parásito en heces a lo largo del periodo de estudio.

7.4.2. Análisis comparativo de dos técnicas serológicas comerciales

En relación con el estudio comparativo de las dos técnicas serológicas comerciales para el diagnóstico de la estrongiloidiasis, la sensibilidad del NIE-ELISA calculada de acuerdo con los dos gold-estándar fue menor del 80%, algo que coincide con las cifras descritas en la literatura (151–153). Por su parte, el CrAg-ELISA evaluado tuvo una sensibilidad de 89,2% con el gold-estándar combinado y de 90,8% con el gold-estándar primario. Estos niveles de sensibilidad del CrAg-ELISA coinciden con los descritos por otros autores (151,154). En cuanto a la especificidad, como era de esperar, el NIE-ELISA fue más específico que el CrAg-ELISA, aunque en el caso del NIE-ELISA los niveles de especificidad de 85,1% y 93,6% son ligeramente más altos que los definidos en estudios similares (151,153). El CrAg-ELISA, por su parte, tuvo una especificidad de 72,3% utilizando el gold-estándar primario, algo que era esperable puesto que en el periodo en el que se realizó el estudio se detectaron larvas en heces en pocos pacientes, debido no solo a la falta de sensibilidad de las técnicas parasitológicas, sino también, como se ha discutido en el apartado anterior, a la heterogeneidad en la petición de las pruebas diagnósticas por parte de los clínicos (es decir, de muchos pacientes solo se disponía de muestras de suero). El nivel de concordancia entre ambas técnicas serológicas fue moderado, al igual que el descrito por Bisoffi et al (151).

Es importante destacar que, a falta de un buen gold-estándar, las cifras de sensibilidad y especificidad diagnóstica de las técnicas serológicas descritas por distintos autores deben ser analizadas con precaución, puesto que van a depender no solo del método de referencia elegido, sino también del tipo de población en la que se aplican dichas técnicas (26). Por ello, al igual que se expone en el presente trabajo, es importante definir la sensibilidad y especificidad en función de puntos de corte distintos a los recomendados por los fabricantes. Aunque no se pudo realizar este sub-análisis debido al reducido número de pacientes en cada grupo, los puntos de corte óptimos probablemente difieran dependiendo del tipo de población estudiada (inmigrantes, viajeros, pacientes inmunodeprimidos, etc.).

Con respecto a la determinación de los isotipos de IgG, a pesar de que en otras infecciones como la hidatidosis (155) tiene aplicación en el diagnóstico y seguimiento, en el caso de la estrongiloidiasis la utilidad ha sido limitada. De los 32 pacientes con serologías discordantes en los que se determinaron los isotipos, solo 4 fueron positivos para IgG1, lo cual indicaría que esos pacientes tienen infecciones crónicas. Por otro lado, en 3 pacientes con serología discordante (CrAg-ELISA positivo y NIE-ELISA negativo) y RT-PCR positiva en heces, la determinación de los isotipos fue negativa, por lo que en la actualidad la gran variabilidad de esta técnica, probablemente debida al peculiar ciclo biológico del parásito, hace que su aplicación en el diagnóstico de la infección por *S. stercoralis* sea limitada.

Por último, aunque una estrategia diagnóstica en dos pasos (*screening* con CrAg-ELISA y posterior confirmación con NIE-ELISA) podría ser interesante, en 3 pacientes se detectó material genético del parásito en heces mediante RT-PCR y fueron seronegativos con NIE-ELISA. A la vista de estos resultados y de los discutidos en el apartado anterior (7.4.1. Análisis de técnicas diagnósticas en el periodo de estudio), la RT-PCR en heces como confirmación de una serología positiva supone un mejor algoritmo diagnóstico que la utilización de dos técnicas serológicas distintas.

7.4.3. Análisis del TTP del APC

El tiempo de incubación de 7 días del APC fue adecuado, detectándose solo el 20% de los pacientes a los 2 días de incubación y el 80% a los 5 días. Se observó un claro aumento del número de APCs que positivizan entre los 6 y 7 días. Hasta la fecha, solo un estudio ha evaluado la influencia del tiempo de incubación de las placas. En dicho estudio se determinó que, aunque la sensibilidad aumentaba más allá

de las 24-48 horas de incubación clásicamente descritas (61,63), a partir del sexto día no se detectaba ningún cultivo positivo de *S. stercoralis* ni de uncinarias (65). A diferencia de lo descrito por este autor, los datos aquí expuestos sugieren que se podrían detectar más casos si se incubaran las placas más de una semana. Son necesarios estudios prospectivos para evaluar el coste-efectividad de esta medida, puesto que a pesar de que probablemente aumentara el número de casos de *S. stercoralis* diagnosticados, esto no solo supondría un aumento de la carga asistencial del laboratorio y un mayor riesgo de contaminación de las placas, sino también una demora en la comunicación de los resultados.

En cuanto al valor diagnóstico y pronóstico del TTP, a diferencia de lo que ocurre en otras infecciones como la tuberculosis o las bacteriemias (156,157), es un campo poco estudiado en el ámbito de la parasitología, probablemente debido a la falta de estandarización y automatización de las técnicas coproparasitológicas en general y del APC en particular. De manera análoga a lo descrito en las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, se planteó la hipótesis de que menores TTPs podrían estar relacionados con una mayor carga parasitaria de manera indirecta (más síntomas digestivos, mayor probabilidad de detección del parásito por VD del concentrado, etc.). De esta forma, los pacientes con TTPs medios menores de 3 días fueron más sintomáticos, en concreto presentaron más clínica digestiva, algo que podría relacionarse a su vez con una mayor carga intestinal del parásito. En cuanto al resto de variables analizadas, aunque se observó una tendencia a la eosinofilia moderada-grave, así como a una mayor detección de larvas en heces por VD en los pacientes con TTPs más bajos, estas asociaciones fueron no significativas, probablemente debido al reducido número de pacientes en el grupo del TTP menor de 3 días. Serían interesantes estudios en áreas de mayor prevalencia de estrongiloidiasis ya que, como se ha descrito en la literatura, los tiempos de detección son generalmente menores (65), permitiendo así hacer un análisis estadístico más potente para establecer la relación del TTP con variables clínicas, analíticas, de tratamiento y de seguimiento.

8. Conclusiones

1. Se describe un importante número de casos de estrongiloidiasis en el periodo analizado, la mayoría de ellos en pacientes inmigrantes latinoamericanos de mediana edad y con tiempos de residencia en España de más de diez años. Menos de la mitad de estos pacientes fueron sintomáticos y la eosinofilia no siempre estuvo presente, por lo que es importante realizar el *screening* a todo paciente con factores de riesgo epidemiológico, incluso con niveles de eosinófilos normales.
2. El seguimiento de los pacientes con estrongiloidiasis fue muy heterogéneo y en muchos casos no se llegó a realizar ningún tipo de seguimiento. Es necesaria la aplicación de protocolos de seguimiento bien definidos. Más de la mitad de los pacientes cumplen criterios de cura serológica y analítica en un periodo de seguimiento inferior a 6 meses.
3. Se ha aumentado la proporción de serologías confirmadas con detección del parásito en heces gracias al aumento del número de peticiones de APC, al incremento del rendimiento diagnóstico de esta técnica y a la introducción de la RT-PCR en heces en la rutina diagnóstica. Se ha conseguido disminuir el número de serologías positivas en pacientes sin factores de riesgo como consecuencia del cambio en la técnica de lavado del ELISA SciMedx®.
4. La técnica serológica comercial basada en antígeno recombinante no fue lo suficientemente sensible y específica para sustituir a la técnica de ELISA basada en antígeno crudo utilizada de rutina en el laboratorio.
5. El tiempo de incubación de 7 días del APC resultó adecuado, no debiéndose reducir a 2 o 5 días ya que se perdería un importante porcentaje de pacientes.

9. Limitaciones

1. Es un estudio realizado en un solo centro y, por tanto, solo representativo de la población atendida en una determinada área sanitaria.
2. El carácter observacional de la mayor parte del estudio probablemente haya influido en el cálculo de algunos parámetros, debido a que no se realizaron todas las pruebas diagnósticas a todos los pacientes.
3. Se trata de un trabajo realizado desde el punto de vista del Servicio de Microbiología, por lo que los datos epidemiológicos y clínicos han sido extraídos de historias clínicas, algunas incompletas. Variables importantes como el alcoholismo, los antecedentes personales de viajes a área endémica y la fecha y pauta de tratamiento están heterogéneamente recogidas.
4. No se realizó la comparación entre pacientes viajeros e inmigrantes debido al escaso número de viajeros.
5. Las limitaciones del diagnóstico parasitológico y la falta de un buen gold-estándar han influido en la definición y clasificación de los casos, incluyéndose criterios epidemiológicos y analíticos.
6. El análisis del seguimiento de los casos tratados está realizado sobre una subpoblación muy pequeña y en la que no se han tenido en cuenta las diferentes pautas de tratamiento.
7. En el análisis comparativo de las dos técnicas serológicas, no se analizaron las posibles reactividades cruzadas con otros parásitos como *Schistosoma* spp., uncinarias y filariasis.

8. En la segunda y tercera parte del trabajo, en las que se analiza el seguimiento de los pacientes tratados y el rendimiento de las distintas técnicas diagnósticas, habría sido interesante hacer un sub-análisis de los pacientes inmunodeprimidos.
9. En el análisis de los TTP han influido factores logísticos del laboratorio, ya que algunos días de fin de semana no se pudo realizar la lectura de las placas.

10. Bibliografía

1. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Vol. 367, Lancet. 2006. p. 1521–32.
2. Bhattacharya S, Azim S. Neglected Tropical Diseases. KJ Gastro [Internet]. 2018 [cited 2017 Jul 31]; Available from: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>
3. Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, et al. Strongyloides stercoralis: A Plea for Action. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(5).
4. Thayer WS. ON THE OCCURRENCE OF STRONGYLOIDES INTESTINALIS IN THE UNITED STATES. J Exp Med. 1901 Nov;6(1):75–105.
5. Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. Strongyloides stercoralis: Global Distribution and Risk Factors. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(7).
6. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. Vol. 391, The Lancet. 2018. p. 252–65.
7. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Mendez A, Munoz J, Gobbi F, et al. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. Epidemiol Infect. 2015 Feb;143(3):452–60.
8. Román-Sánchez P, Pastor-Guzmán A, Moreno-Guillén S, Igual-Adell R, Suñer-Generoso S, Tornero-Estébanez C. High prevalence of Strongyloides stercoralis among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: analysis of the predictive factors of infection in developed countries. Am J Trop Med Hyg. 2003;
9. Wagenvoort JH, Houben HG, Boonstra GL, Scherpbier J. Pulmonary superinfection with Strongyloides stercoralis in an immunocompromised retired coal miner. Vol. 13, European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. Germany; 1994. p. 518–9.

10. Ramírez-Olivencia G, Espinosa MÁC, Martín AB, Núñez NI, de las Parras ER, Núñez ML, et al. Imported strongyloidiasis in Spain. *Int J Infect Dis*. 2014;18(1):32–7.
11. Valerio L, Roure S, Fernández-Rivas G, Basile L, Martínez-Cuevas O, Ballesteros ÁL, et al. *Strongyloides stercoralis*, the hidden worm. Epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the North Metropolitan Area of Barcelona, Spain, 2003-2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(8):465–70.
12. Mascarello M, Gobbi F, Angheben A, Gobbo M, Gaiera G, Pegoraro M, et al. Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among HIV-positive immigrants attending two Italian hospitals, from 2000 to 2009. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2011 Dec;105(8):617–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325821>
13. Perez-Molina JA, Lopez-Polin A, Trevino B, Molina I, Goikoetxea J, Diaz-Menendez M, et al. 6-year review of +Redivi: a prospective registry of imported infectious diseases in Spain. *J Travel Med*. 2017 Sep;24(5).
14. Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, et al. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. Vol. 8, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014.
15. Sánchez PR, Guzmán P, Guillen SM, Adell RI, Estruch AM, Gonzalo IN, et al. Endemic strongyloidiasis on the Spanish Mediterranean coast. *QJM* [Internet]. 2001;94(7):357–63. Available from: <http://qjmed.oxfordjournals.org/content/qjmed/94/7/357.full.pdf>
16. Oltra Alcaraz C, Igual Adell R, Sánchez Sánchez P, Viñals Blasco MJ, Sánchez OA, Sarrión Auñón A, et al. Characteristics and geographical profile of strongyloidiasis in healthcare area 11 of the Valencian community (Spain). *J Infect*. 2004;49(2):152–8.
17. Fernandez Rodriguez C, Enriquez-Matas A, Sanchez Millan ML, Mielgo Ballesteros R, Jukic Beteta KD, Valdez Tejeda M, et al. *Strongyloides stercoralis* infection: a series of cases diagnosed in an allergy department in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(6):455–7.

18. Barroso M, Salvador F, Sanchez-Montalva A, Bosch-Nicolau P, Molina I. Strongyloides stercoralis infection: A systematic review of endemic cases in Spain. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Mar;13(3):e0007230.
19. Martinez-Perez A, Lopez-Velez R. Is strongyloidiasis endemic in Spain? PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb;9(2):e0003482.
20. Sheorey H, Biggs B-A, Ryan N. Nematodes. In: Jorgensen J, Pfaller M, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2015. p. 2456.
21. Viney ME, Lok JB. The biology of Strongyloides spp. WormBook. 2015 Jul;1–17.
22. Thamsborg SM, Ketzis J, Horii Y, Matthews JB. Strongyloides spp. infections of veterinary importance. Vol. 144, Parasitology. 2017. p. 274–84.
23. Forrer A, Khieu V, Schar F, Vounatsou P, Chammartin F, Marti H, et al. Strongyloides stercoralis and hookworm co-infection: spatial distribution and determinants in Preah Vihear Province, Cambodia. Parasit Vectors. 2018 Jan;11(1):33.
24. Becker SL, Sieto B, Silué KD, Adjossan L, Koné S, Hatz C, et al. Diagnosis, Clinical Features, and Self-Reported Morbidity of Strongyloides stercoralis and Hookworm Infection in a Co-Endemic Setting. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2011 Aug 23;5(8):e1292. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001292>
25. Toledo R, Muñoz-Antoli C, Esteban J-GG. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. Adv Parasitol [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2019 May 6];88:165–241. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X15000147?via%3Dihub>
26. Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Clin Microbiol Infect. 2015;21(6):543–52.
27. CDC - DPDx - Strongyloidiasis [Internet]. [cited 2017 Jul 31]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>

28. Gill G V., Welch E, Bailey JW, Bell DR, Beeching NJ. Chronic *Strongyloides stercoralis* infection in former British Far East prisoners of war. QJM - Mon J Assoc Physicians. 2004;97(12):789–95.
29. Conway DJ, Hall A, Anwar KS, Rahman ML, Bundy DAP. Household aggregation of *strongyloides stercoralis* infection in Bangladesh. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89(3):258–61.
30. Czachor JS, Jonas AP. Transmission of *Strongyloides steracolis* Person to Person. J Travel Med. 2010;7(4):211–2.
31. Girardeau MHF, Brown RC. Transmammary Passage of *Strongyloides* Sp. Larvae in the Human Host *. Am J Trop Med Hyg. 2017;26(2):215–9.
32. Sorvillo F, Mori K, Sewake W, Fishmant L. Sexual Transmission of *Strongyloides stercoralis* among homosexual men. Sex Transm Infect. 1983;59(5):342.
33. Brugemann J, Kampinga GA, Riezebos-Brilman A, Stek CJ, Edel JP, van der Bij W, et al. Two donor-related infections in a heart transplant recipient: one common, the other a tropical surprise. J Heart Lung Transplant. 2010 Dec;29(12):1433–7.
34. Rodriguez-Hernandez MJ, Ruiz-Perez-Pipaon M, Canas E, Bernal C, Gavilan F. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection transmitted by liver allograft in a transplant recipient. Am J Transplant. 2009 Nov;9(11):2637–40.
35. Hamilton KW, Abt PL, Rosenbach MA, Bleicher MB, Levine MS, Mehta J, et al. Donor-derived *Strongyloides stercoralis* infections in renal transplant recipients. Transplantation. 2011 May;91(9):1019–24.
36. Transmission of *Strongyloides stercoralis* through transplantation of solid organs--Pennsylvania, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2013 Apr;62(14):264–6.
37. Hsu CN, Tseng SH, Chang SW, Chen Y. *Strongyloides stercoralis* infection in an intestinal transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2013 Aug;15(4):E139-43.

38. Jaleta TG, Zhou S, Bemm FM, Schär F, Khieu V, Muth S, et al. Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans—Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8).
39. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. Vol. 144, *Parasitology*. 2017. p. 263–73.
40. Mir A, Benahmed D, Igual R, Borrás R, O'Connor JE, Moreno MJ, et al. Eosinophil-selective mediators in human strongyloidiasis. *Parasite Immunol*. 2006;28(8):397–400.
41. Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm Infection. October. 2004;3518:799–807.
42. Brumpt LC, Sang HT. [Larva currens: the only pathognomonic sign of strongyloidiasis]. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1973;48(2):319–28.
43. Corte LD, da Silva MVS, Souza PRM. Simultaneous Larva Migrans and Larva Currens Caused by *Strongyloides stercoralis*: A Case Report. *Case Rep Dermatol Med* [Internet]. 2013;2013:1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/381583>
44. Leighton PM, MacSween HM. *Strongyloides stercoralis*. The cause of an urticarial-like eruption of 65 years' duration. *Arch Intern Med* [Internet]. 1990;150(8):1747–8. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=2383168>
45. Pichard DC, Hensley JR, Williams E, Apolo AB, Klion AD, DiGiovanna JJ. Rapid development of migratory, linear, and serpiginous lesions in association with immunosuppression. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Jun;70(6):1130–4.
46. Showler A, Boggild AK. Strongyloidiasis Presenting as Larva Currens 38 Years after Presumed Exposure. 2012;16(6):433–5.

47. Velasco A, Sanchez F, de la Coba C, Fradejas P, Prieto V, Alvarez A, et al. [Malabsorption syndrome due to *Strongyloides stercoralis* associated with Loeffler syndrome in a 29-year-old woman]. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29(6):341–4.
48. Akuthota P, Weller PF. Eosinophilic Pneumonias. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):649–60.
49. Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. Vol. 17, *Clinical Microbiology Reviews*. 2004. p. 208–17.
50. Concha R, Harrington W, Rogers AI. Intestinal Strongyloidiasis Recognition, Management, and Determinants of Outcome. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(3):203–11.
51. Husni RN, Gordon SM, Longworth DL, Adal KA. Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in an immunocompetent patient. Vol. 23, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. United States; 1996. p. 663.
52. Schein F, Fouillet L, Lutz MF, Daguenet E, Botelho-Nevers E, Cornillon J. Recurrent *Enterococcus faecalis* meningitis in a patient presenting with *Strongyloides* hyperinfection syndrome during HTLV-1-induced T-cell lymphoma. Vol. 48, *Medecine et maladies infectieuses*. France; 2018. p. 428–30.
53. Woll F, Gotuzzo E, Montes M. *Strongyloides stercoralis* infection complicating the central nervous system [Internet]. 1st ed. Vol. 114, *Handbook of Clinical Neurology*. 2013, Elsevier B.V. All rights reserved.; 2013. 229–234 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00017-0>
54. Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Munoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb;13:78.
55. Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1993 Sep;7(3):655–82.
56. Morakote N, Phongsri S, Uparanukraw P. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(6):967–73.

57. Campo-Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona-Arias J. Diagnosis of Strongyloides Stercoralis infection. Meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013). Rev Esp Salud Pública N°5 Septiembre-Octubre. 2014;88:581–600.
58. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection. Clin Infect Dis. 2002;33(7):1040–7.
59. Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, Ikeshiro T. Efficacy of Agar-Plate Culture in Detection of Strongyloides stercoralis Infection. J Parasitol. 2006;76(3):425.
60. de Kaminsky RG. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. J Parasitol. 1993 Apr;79(2):277–80.
61. Arakaki T, Hasegawa H, Asato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, et al. A new method to detect Strongyloides stercoralis from human stool. Japanese J Trop Med Hyg. 1988;16:11–7.
62. Panosian KJ, Marone P, Edberg SC. Elucidation of Strongyloides stercoralis by bacterial-colony displacement. J Clin Microbiol. 1986 Jul;24(1):86–8.
63. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, et al. A modified agar plate method for detection of Strongyloides stercoralis. Am J Trop Med Hyg. 1991 Oct;45(4):518–21.
64. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukavat K, Nakamuraf Y, Tanifs S, et al. An evaluation of the agar-plate method for detection of Strongyloides stercoralis in northern Thailand. J Trop Med Hyg. 1990;93:183–8.
65. Jongwutiwes S, Charoenkorn M, Sitthichareonchai P, Akaraborvorn P, Putaporntip C. Increased sensitivity of routine laboratory detection of Strongyloides stercoralis and hookworm by agar-plate culture. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(4):398–400.

66. Martin-Rabadan P, Martinez-Ruiz R, Cuadros J, Canavate C. [Clinical microbiology laboratory and imported parasitic diseases]. El Lab Microbiol ante las enfermedades Parasit importadas [Internet]. 2010;28(10):719–25. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=20932605>
67. Kristanti H, Meyanti F, Wijayanti MA, Mahendradhata Y, Polman K, Chappuis F, et al. Diagnostic comparison of Baermann funnel, Koga agar plate culture and polymerase chain reaction for detection of human *Strongyloides stercoralis* infection in Maluku, Indonesia. Parasitol Res [Internet]. 2018;117(10):3229–35. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L623527799%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-6021-5>
68. Sharifdini M, Mirhendi H, Ashrafi K, Hosseini M, Mohebbi M, Khodadadi H, et al. Comparison of nested polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods for detection of *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(6):1285–91.
69. Khieu V, Schar F, Forrer A, Hattendorf J, Marti H, Duong S, et al. High prevalence and spatial distribution of *Strongyloides stercoralis* in rural Cambodia. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jun;8(6):e2854.
70. Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, et al. Short report: Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(4):683–4.
71. Nielsen PBO, Mojon M. Improved Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* by Seven Consecutive Stool Specimens. Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene / A Med Microbiol Infect Dis Virol Parasitol [Internet]. 1987;263(4):616–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-6724\(87\)80207-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-6724(87)80207-9)
72. Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. Am J Trop Med Hyg. 1995;53(3):248–50.

73. Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Jan;7(1):e2002.
74. Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Oct;103(10):967–72.
75. Sudarshi S, Stümpfle R, Armstrong M, Ellman T, Parton S, Krishnan P, et al. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. *Trop Med Int Heal*. 2003;8(8):728–32.
76. Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Infect Dis*. 2008;198(3):444–51.
77. Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M, Monteiro GB, et al. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(2):129–33.
78. Gonçalves ALR, Nunes DS, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012;139(7):956–61.
79. Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, Muhammad Hafiznur Y, Low HC, Zeehaida M, et al. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. *Parasite Immunol*. 2013;35(5–6):174–9.
80. Bon B, Houze S, Talabani H, Magne D, Belkadi G, Develoux M, et al. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1716–9.
81. Turrientes M-C, Perez de Ayala A, Norman F, Navarro M, Perez-Molina J-A, Rodríguez-Ferrer M, et al. Visceral larva migrans in immigrants from latin america. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jul;17(7):1263–5.

82. Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffe I, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 Recombinant Antigen Based Assays for Immunodiagnosis of Strongyloidiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(4).
83. Perez-Molina JA, Diaz-Menendez M, Perez-Ayala A, Ferrere F, Monje B, Norman F, et al. [Treatment of diseases caused by parasites]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Jan;28(1):44–59.
84. Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva F a. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. Mol Biochem Parasitol. 2002;125(1–2):73–81.
85. Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni MB, Mowlavi G, Kia E. Molecular diagnosis of strongyloides stercoralis infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. Iran J Parasitol. 2011;6(2):23–30.
86. Sitta RB, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RCB, Malta FM, Pinho JR, et al. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. Parasitology [Internet]. 2014;(2014):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476900>
87. Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienens EAT, Polderman AM, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(4):342–6.
88. Saugar JM, Merino FJ, Martín-Rabadán P, Fernández-Soto P, Ortega S, Gárate T, et al. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. Acta Trop. 2015;142:20–5.
89. Becker SL, Piraisoody N, Kramme S, Marti H, Silué KD, Panning M, et al. Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Côte d'Ivoire: Diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. Acta Trop. 2015;150:210–7.
90. Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection-A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Feb;12(2):e0006229.

91. Sultana Y, Jeoffreys N, Watts MR, Gilbert GL, Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1048–51.
92. Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):338–43.
93. Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper PJ, Nutman TB. A Novel , Multi-Parallel , Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for Eight Gastrointestinal Parasites Provides Improved Diagnostic Capabilities to Resource-Limited At-Risk Populations. 2013;88(6):1041–7.
94. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Van Lieshout L, Petri WA, et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):332–7.
95. Fernández-Soto P, Sánchez-Hernández A, Gandasegui J, Bajo Santos C, López-Abán J, Saugar JM, et al. Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(7).
96. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):306–11.
97. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites-Strongyloides [Internet]. Resources for Health Professionals. 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>
98. Gotuzzo E, Echevarria J, Ac WJ, Terashima A, Samalvides F, Ja P, et al. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection (Review). 2016;(1).

99. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis* [Internet]. Vol. 25, Current Opinion in Infectious Diseases. 2012. p. 458–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3430846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Dreyer G, Fernandes-Silva E, Alves S, Rocha A, Albuquerque R, Addiss D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: Implications for diagnosis and clinical trials. J Clin Microbiol. 1996;34(10):2569–71.
101. Kobayashi J, Sato Y, Toma H, Takara M, Shiroma Y. Application of enzyme immunoassay for postchemotherapy evaluation of human strongyloidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1994 Jan;18(1):19–23.
102. Loutfy MR, Wilson M, Keystone JS, Kain KC. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):749–52.
103. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Saugar JM, Rodríguez E, Pahissa A, et al. Usefulness of strongyloides stercoralis serology in the management of patients with eosinophilia. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(5):830–4.
104. Requena-Méndez A, Buonfrate D, Gomez-Junyent J, Zammarchi L, Bisoffi Z, Muñoz J. Evidence-based guidelines for screening and management of strongyloidiasis in non-endemic countries. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(3):645–52.
105. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Carrillo E, Molina I. Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(4):1–8.
106. Salvador F, Sulleiro E, Piron M, Sánchez-Montalvá A, Sauleda S, Molina-Morant D, et al. Strongyloides stercoralis infection increases the likelihood to detect Trypanosoma cruzi DNA in peripheral blood in Chagas disease patients. Trop Med Int Heal. 2017;22(11):1436–41.

107. Monteiro R V, Dietz JM, Raboy B, Beck B, De Vleeschouwer K, Baker A, et al. Parasite community interactions: *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths infecting wild golden lion tamarins *Leontopithecus rosalia* and golden-headed lion tamarins *L. chrysomelas* (Callitrichidae, L., 1766). *Parasitol Res.* 2007 Nov;101(6):1689–98.
108. Rodriguez M, Terrazas LI, Marquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol.* 1999 Apr;21(4):177–85.
109. Puerta-Alcalde P, Gomez-Junyent J, Requena-Mendez A, Pinazo MJ, Álvarez-Martínez MJ, Rodríguez N, et al. High prevalence of *S. Stercoralis* infection among patients with Chagas disease: A retrospective case-control study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(1):1–11.
110. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcantara L, et al. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol.* 2001 Sep;23(9):503–7.
111. Shimasaki T, Chung H, Shiiki S. Case report: Five cases of recurrent meningitis associated with chronic strongyloidiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(3):601–4.
112. Carvalho EM, Da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1. *Parasite Immunol* [Internet]. 2002;26(11–12):487–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771684>
113. Marques CC, Zago-Gomes M da P, Gonçalves CS, Pereira FEL. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: Daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):4–7.
114. Zago-gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Gonçalves CS, Pereira FEL. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients Frequência de nematóides intestinais em pacientes alcoólatras. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(6):571–4.
115. Teixeira MCA, Pacheco FTF, Souza JN, Silva MLS, Inês EJ, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients . *Biomed Res Int.* 2016;2016:1–11.

116. Ayuntamiento de Madrid. Padrón Municipal de Habitantes [Internet]. [cited 2019 May 29]. Available from: <https://www.madrid.es/portales/munimadrid/es/Inicio/El-Ayuntamiento/Estadistica/Areas-de-informacion-estadistica/Demografia-y-poblacion/Cifras-de-poblacion/Padron-Municipal-de-Habitantes-2018/?vgnnextfmt=default&vgnextoid=887eddf3e78f3610VgnVCM1000001d4a90>
117. Vila J, Alvarez-Martinez MJ, Buesa J, Castillo J. [Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(7):406–11.
118. Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 May;76(1):31–5.
119. Cabezas-Fernández MT, Salas-Coronas J, Lozano-Serrano AB, Vazquez-Villegas J, Cabeza-Barrera MI, Cobo F. Strongyloidiasis in immigrants in Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015;33(1):37–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.06.010>
120. Salvador F, Trevino B, Chamorro-Tojeiro S, Sanchez-Montalva A, Herrero-Martinez JM, Rodriguez-Guardado A, et al. Imported strongyloidiasis: Data from 1245 cases registered in the +REDIVI Spanish Collaborative Network (2009-2017). *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May;13(5):e0007399.
121. Belhassen-García M, Alonso-Sardón M, Martinez-Perez A, Soler C, Carranza-Rodriguez C, Pérez-Arellano JL, et al. Surveillance of strongyloidiasis in Spanish inpatients (1998–2014). *PLoS One*. 2017;12(12):1–14.
122. Ramos JM, Leon R, Andreu M, de las Parras ER, Rodriguez-Diaz JC, Esteban A, et al. Serological study of *Trypanosoma cruzi*, *Strongyloides stercoralis*, HIV, human T cell lymphotropic virus (HTLV) and syphilis infections in asymptomatic Latin-American immigrants in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015 Jul;109(7):447–53.
123. Llenas-García J, Fiorante S, Salto E, Maseda D, Rodríguez V, Matarranz M, et al. Should we look for *Strongyloides stercoralis* in foreign-born HIV-infected persons? *J Immigr Minor Heal*. 2013;15(4):796–802.
124. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relev Epidemiol Hebd*. 2015 Feb;90(6):33–43.

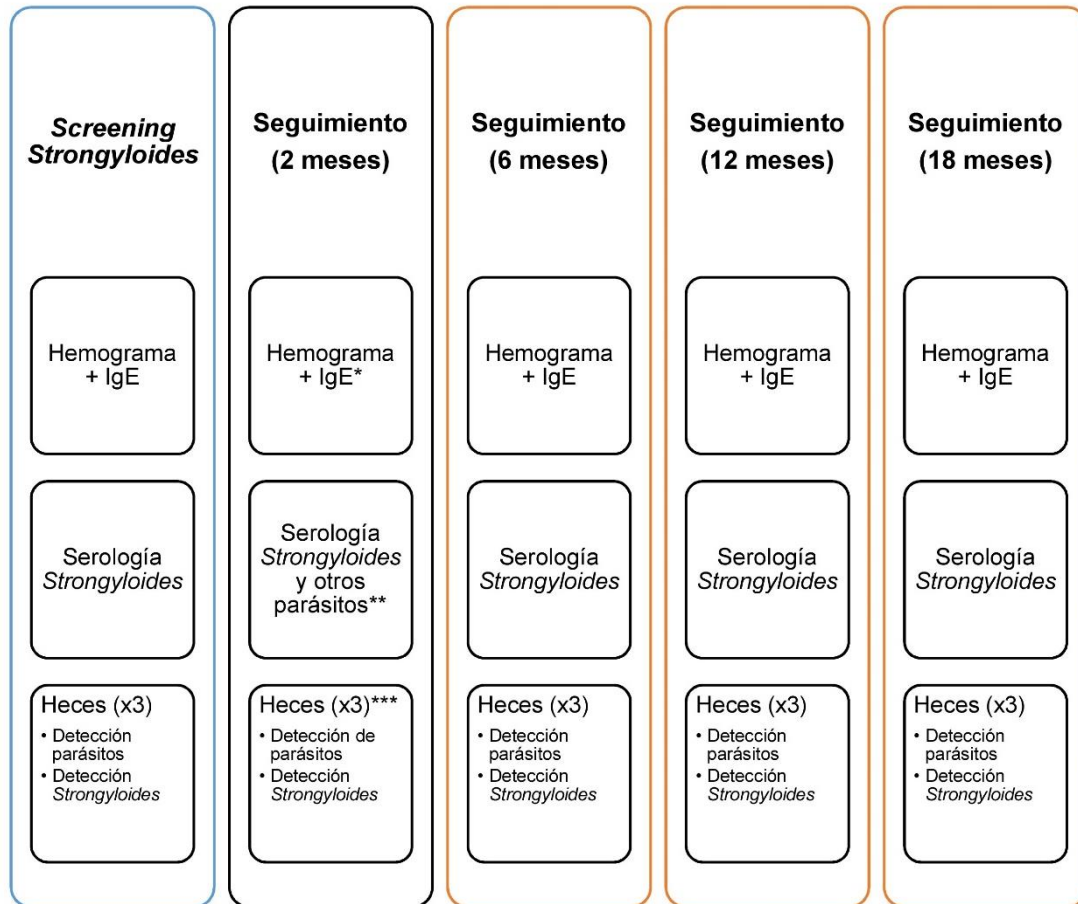
125. Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. *Taenia solium* human cysticercosis: A systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):1–20.
126. Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):1–39.
127. Fradejas I, Herrero-Martinez JM, Lizasoain M, Rodriguez de Las Parras E, Perez-Ayala A. Comparative study of two commercial tests for *Strongyloides stercoralis* serologic diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2018 Dec;112(12):561–7.
128. Buonfrate D, Baldissera M, Abrescia F, Bassetti M, Caramaschi G, Giobbia M, et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in northern Italy: Results of a multicentre case-control study, February 2013 to July 2014. *Eurosurveillance*. 2016;21(31).
129. Forrer A, Khieu V, Schär F, Hattendorf J, Marti H, Neumayr A, et al. *Strongyloides stercoralis* is associated with significant morbidity in rural Cambodia, including stunting in children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10):1–17.
130. De Alegria MLAR, Colmenares K, Espasa M, Amor A, Lopez I, Nindia A, et al. Prevalence of *strongyloides stercoralis* and other intestinal parasite infections in school children in a rural area of Angola: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(4):1226–31.
131. González Ana A, Gallo M, Valls ME, Muñoz J, Puyol L, Pinazo MJ, et al. Clinical and epidemiological features of 33 imported *Strongyloides stercoralis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(9):613–6.
132. Praena-segovia J, Pipaón MR De, Bosh-guerra X, Sánchez-agüera M, Álvarez-martínez D, Miguel J. Aproximación clínica a la eosinofilia importada. 2016;34(10):661–84.
133. Salas-Coronas J, Cabezas-Fernández MT, Vázquez-Villegas J, Soriano-Pérez MJ, Lozano-Serrano AB, Pérez-Camacho I, et al. Evaluation of eosinophilia in immigrants in Southern Spain using tailored screening and treatment protocols: A prospective study. *Travel Med Infect Dis*. 2015;13(4):315–21.

134. Serre-Delcor N, Treviño B, Monge B, Salvador F, Torrus D, Gutiérrez-Gutiérrez B, et al. Eosinophilia prevalence and related factors in travel and immigrants of the network +REDIVI. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(10):617–23.
135. Roxby AC, Gottlieb GS, Limaye AP. Strongyloidiasis in Transplant Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;49(9):1411–23. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/630201>
136. Quintero O, Berini CA, Waldbaum C, Avagnina A, Juarez M, Repetto S, et al. Importance of a rapid and accurate diagnosis in *Strongyloides Stercoralis* and human t-lymphotropic virus 1 co-infection: A case report and review of the literature. *Front Microbiol*. 2017;8(DEC):1–5.
137. Cabezas T, Perez-Arellano JL, Martinez-Perez A, Torrús-Tendero D, Treviño B, Salvador F, et al. Management of severe strongyloidiasis attended at reference centers in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(2):e0006272.
138. Higashiarakawa M, Hirata T, Tanaka T, Parrott G, Kinjo T, Naka H, et al. Normal serum IgE levels and eosinophil counts exhibited during *Strongyloides stercoralis* infection. *Parasitol Int* [Internet]. 2017;66(1):807–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.004>
139. Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, Zaha O, Kinjo N, Hokama A, et al. Impairment of host immune response against strongyloides stercoralis by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Feb;74(2):246–9.
140. Atkins NS, Conway DJ, Lindo JF, Bailey JW, Bundy DAP. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: Correlations with larval output. *Parasite Immunol*. 1999;21(10):517–26.
141. Gétaz L, Castro R, Zamora P, Kramer M, Gareca N, Torrico-Espinoza M del C, et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* infection in Bolivian patients at high risk of complications. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):1–16.
142. Luvira V, Trakulhun K, Mungthin M, Naaglor T, Chantawat N, Pakdee W, et al. Comparative diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(2):401–4.

143. Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R, et al. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):346–50.
144. Osiro S, Hamula C, Glaser A, Rana M, Dunn D. A case of Strongyloides hyperinfection syndrome in the setting of persistent eosinophilia but negative serology. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017;88(2):168–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.02.016>
145. Repetto SA, Ruybal P, Batalla E, López C, Fridman V, Sierra M, et al. Strongyloidiasis Outside Endemic Areas: Long-term Parasitological and Clinical Follow-up after Ivermectin Treatment. *Clin Infect Dis.* 2018;66(10):1558–65.
146. Nuesch R, Zimmerli L, Stockli R, Gyr N, Christoph Hatz FR. Imported strongyloidosis: a longitudinal analysis of 31 cases. *J Travel Med* [Internet]. 2005;12(2):80–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996452>
147. Repetto SA, Durán PA, Lasala MB, González-Cappa SM. High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(6):1088–93.
148. Knopp S, Mgeni AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, et al. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: Effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(11).
149. Amor A, Rodriguez E, Saugar JM, Arroyo A, López-Quintana B, Abera B, et al. High prevalence of Strongyloides stercoralis in school-aged children in a rural highland of north-western Ethiopia: The role of intensive diagnostic work-up. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):617. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27903301>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5131444>
150. Repetto SA, Ruybal P, Solana ME, López C, Berini CA, Alba Soto CD, et al. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of Strongyloides stercoralis out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Trop.* 2016;157:169–77.

151. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, et al. Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):38.
152. Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli AF, Levecke B, Socias E, et al. A Public Health Response against *Strongyloides stercoralis*: Time to Look at Soil-Transmitted Helminthiasis in Full. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5).
153. Anderson NW, Klein DM, Dornink SM, Jespersen DJ, Kubofcik J, Nutman TB, et al. Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(5):732–6.
154. Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JCFM, Wismans PJ, et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):438–42.
155. Mourglia-Ettlin G, Miles S, Hernandez A, Dematteis S. Antibody profiling in ultrasound normal individuals with positive serology for cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2016 Feb;38(2):93–100.
156. Ning Y, Hu R, Yao G, Bo S. Time to positivity of blood culture and its prognostic value in bloodstream infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Apr;35(4):619–24.
157. Kayigire XA, Friedrich SO, Venter A, Dawson R, Gillespie SH, Boeree MJ, et al. Direct comparison of Xpert MTB/RIF assay with liquid and solid mycobacterial culture for quantification of early bactericidal activity. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1894–8.

Anexo 1. Material suplementario



* Solo pedir si eosinofilia en consulta de screening.

** Solo pedir si serologías positivas para otros parásitos y *Strongyloides* en consulta de screening.

*** Solo pedir si detección de parásitos y/o *Strongyloides* y/o PCR en heces positiva en consulta de screening.

Figura 28. Protocolo de screening y seguimiento de pacientes atendidos en la consulta de Medicina Interna/Infecciosas.

Tabla 19. N° de casos confirmados y tasas de incidencia (n° casos confirmados/100.000 habitantes) por año de estudio.

Año	Casos confirmados	Incidencia en la población general (solo casos confirmados)	Casos confirmados en inmigrantes	Incidencia en la población inmigrante (solo casos confirmados)
Jun-Dic 2013	5	0,95	5	6,51
2014	5	0,96	5	7,26
2015	13	2,53	12	19,49
2016	35	6,65	33	52,57
2017	29	5,56	29	47,81
Ene-Oct 2018	17	3,20	17	23,12
Media	20	3,69	20	29,39

❖ Análisis de los casos indeterminados

Se analizaron un total de 38 pacientes. De ellos, 36 fueron pacientes con serología positiva y sin detección de larvas de *S. stercoralis* en heces y 2 fueron pacientes con serología y RT-PCR en heces positiva. En 24 (63,1%) pacientes se desconocían los factores de riesgo epidemiológico y en los 14 (39,9%) restantes no se detectó ningún factor de riesgo epidemiológico.

De los 38 pacientes, 26 (68,4%) no recibieron tratamiento antihelmíntico específico, negativizando la serología en una segunda visita 11 de los 26 pacientes (en los 15 casos restantes no se remitieron muestras serológicas de seguimiento). De los 12 (31,6%) pacientes que recibieron tratamiento específico, 3 siguieron teniendo serología positiva en el seguimiento, uno negativizó la serología y en 8 no se dispuso de ninguna muestra de seguimiento.

El servicio peticionario principal fue Alergia (42,1%), seguido de Medicina Interna/Infecciosas (31,6%). El motivo de consulta principal fue la clínica dermatológica (33,3%), seguido de la eosinofilia (25,0%). La clínica principal en los 25 pacientes sintomáticos fue la dermatológica (17/25) seguida de la respiratoria (7/25).

Ninguno de los dos pacientes con RT-PCR positiva en heces tenía eosinofilia, recibió tratamiento antihelmíntico ni tuvo seguimiento serológico. Uno de ellos tenía clínica dermatológica (urticaria) y el otro fue asintomático.

Tabla 20. Características demográficas, clínicas y analíticas de los 38 pacientes sin factores de riesgo con serología positiva de *S. stercoralis*.

Variable	Frecuencia (%), N=38
Género masculino	16 (42,1)
Edad (años), mediana (IQR)	45,5 (31-58)
Síntomas	25 (65,8)
Eosinofilia absoluta o relativa	21 (55,3)
Tratamiento antihelmíntico	12 (31,6)
VD realizada	32 (64,2)
APC realizado	22 (57,9)
RT-PCR realizada	10* (26,3)
Índice serológico, mediana (IQR)	1,6 (1,3-2,4)

* 2 RT-PCRs positivas, 2 inhibidas y 6 negativas.

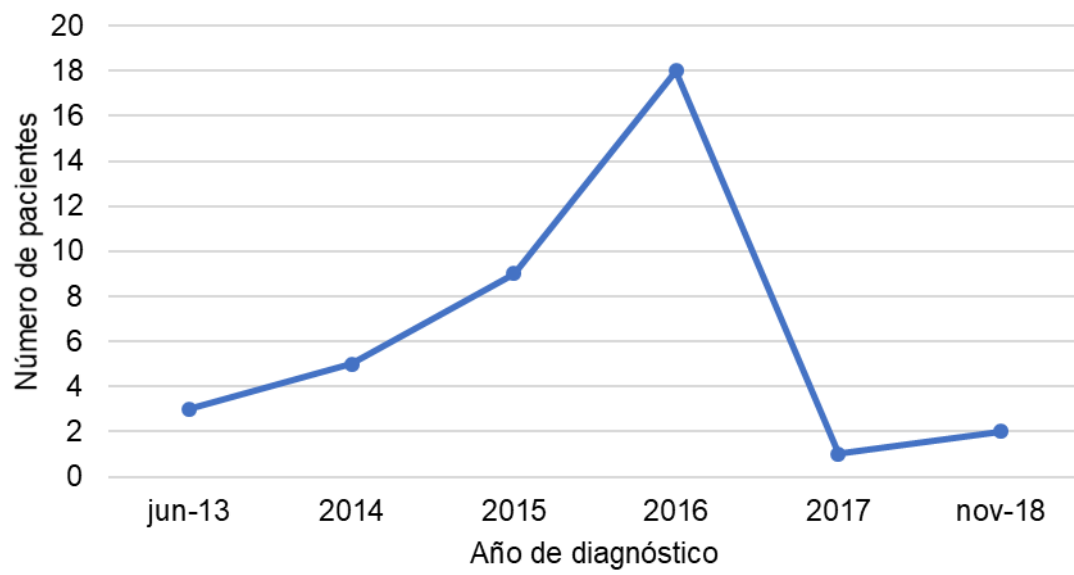


Figura 29. Número de casos indeterminados por año de diagnóstico.

Tabla 21. Países de origen de los pacientes incluidos en el estudio (N=276).

País	Frecuencia (%) [N=276]
Ecuador	60 (21,7)
Bolivia	54 (19,6)
Colombia	28 (10,1)
Guinea Ecuatorial	18 (6,5)
Perú	17 (6,2)
República Dominicana	15 (5,4)
España	10 (3,6)
Paraguay	9 (3,3)
Honduras	7 (2,5)
Nigeria	7 (2,5)
Cuba	6 (2,2)
Brasil	5 (1,8)
Argentina	3 (1,1)
Guinea Conakry	3 (1,1)
India	3 (1,1)
Mali	3 (1,1)
Marruecos	3 (1,1)
Venezuela	3 (1,1)

País	Frecuencia (%) [N=276]
China	2 (0,7)
Filipinas	2 (0,7)
Guinea Bissau	2 (0,7)
México	2 (0,7)
Nicaragua	2 (0,7)
Benín	1 (0,4)
Cabo Verde	1 (0,4)
Camerún	1 (0,4)
Egipto	1 (0,4)
Gambia	1 (0,4)
Kenia	1 (0,4)
Portugal	1 (0,4)
Rumania	1 (0,4)
Senegal	1 (0,4)
Serbia	1 (0,4)
Uruguay	1 (0,4)
Vietnam	1 (0,4)

Tabla 22. Número de muestras de heces recibidas por paciente y técnicas diagnósticas positivas.

Número de concentrados diagnósticos realizados por paciente	Frecuencia (%) [N=276]	Número de concentrados diagnósticos positivos por paciente	Frecuencia (%) [N=234*]
0	42 (15,2)	0	212 (90,6)
1	32 (11,6)	1	9 (3,8)
2	23 (8,3)	2	6 (2,6)
3	160 (58,0)	3	10 (4,3)
>3	19 (6,9)	>3	0
Número de cultivos diagnósticos realizados por paciente	Frecuencia (%) [N=276]	Número de cultivos diagnósticos positivos por paciente	Frecuencia (%) [N=201**]
0	75 (27,2)	0	130 (64,7)
1	40 (14,5)	1	31 (15,4)
2	23 (8,3)	2	20 (10,0)
3	131 (47,5)	3	22 (10,1)
>3	7 (2,5)	>3	2 (1,0)

* Pacientes con al menos una muestra de heces remitida para la realización de la visualización directa del concentrado.

** Pacientes con al menos una muestra de heces remitida para la realización del agar-cultivo.

❖ **Análisis univariante y multivariante****Tabla 23. Análisis univariante y multivariante: casos confirmados vs. casos no confirmados.**

Variable, n (%)	Casos confirmados [N=104]	Casos no confirmados [N=172]	p valor	Análisis multivariante OR (IC95%) p valor
Género masculino	56 (53,9)	79 (45,9)	0,202	-
Edad [años], media (±SD)	47,2 (±14,3)	41,8 (±13,0)	0,001	-
Inmigrante	101 (97,1)	162 (94,2)	0,382	-
Origen latinoamericano*	88/101 (87,1)	125/162 (77,2)	0,045	-
Tiempo de estancia en España* [años], mediana (IQR)	13,0 (8,9-16,5) [N=91]	12,1 (7,6-15,2) [N=138]	0,187	-
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	23,7 (10,7-47,7) [N=69]	21,9 (4,0-44,7) [N=99]	0,508	-
Sintomático	52 (50,5)	76 (44,2)	0,311	-
Síntomas cutáneos	26/52 (50,0)	33/76 (43,4)	0,463	-
Síntomas digestivos	31/52 (59,6)	27/76 (35,5)	0,007	2,69 (1,28-5,70) p=0,009
Síntomas respiratorios	7/52 (13,5)	20/76 (26,3)	0,080	-
Tratamiento específico	95 (91,3)	105 (61,0)	<0,001	6,55 (2,54-18,92) p<0,001
Inmunosupresión	17 (16,4)	36 (20,9)	0,349	-
Enfermedad de Chagas	12/69** (17,4)	17/82** (20,7)	0,681	-
Alguna PCR de Chagas positiva	3/11*** (27,3)	1/17 (5,9)	0,269	-
Comorbilidad general	44 (42,3)	46 (26,4)	0,008	-
Alcoholismo	13 (13,4)	9 (6,0)	0,066	-
Eosinofilia absoluta o relativa	87 (83,7)	85 (49,4)	<0,001	2,29 (1,07-4,90) p=0,033
Eosinofilia moderada-grave****	42 (51,2) [N=82]	19 (26,4) [N=72]	0,002	2,43 (1,13-5,20) p=0,022
Recuento de eosinófilos [células/μL], mediana (IQR)	1000 (500-1250)	400 (100-800)	<0,001	-
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	12,8 (7,6-18,6)	4,4 (1,8-10,9)	<0,001	-
Niveles de IgE [kU/L], mediana (IQR)	603 (253-1830) [N=19]	510 (165-1398) [N=40]	0,307	-
Índex serológico [S/CO], mediana (IQR)	4,5 (2,5-8,0) [N=95]	2,2 (1,4-3,7) [N=172]	<0,001	1,19 (1,07-1,32) p=0,001

* Del total de inmigrantes, excluidos los viajeros (N=263).

** Del total de inmigrantes latinoamericanos con *screening* de Chagas realizado (N=151).

*** A un paciente con enfermedad de Chagas no se le realizó ninguna PCR.

**** Del total de pacientes con eosinofilia absoluta (N=154).

Tabla 24. Análisis univariante y multivariante: inmunosuprimidos vs. inmunocompetentes.

Variable, n (%)	Inmunosuprimidos [N=53]	Inmunocompetentes [N=223]	p valor	Análisis multivariante OR (IC95%) p valor
Género masculino	34 (64,2)	101 (45,3)	0,014	2,20 (1,13-4,28) p=0,020
Edad [años], media (±SD)	41,9 (±13,8)	44,2 (±13,7)	0,253	-
Inmigrante	51 (96,2)	212 (95,1)	1,000	-
Origen latinoamericano*	34/51 (66,7)	179/212 (84,4)	0,004	-
Tiempo de estancia en España* [años], mediana (IQR)	10,1 (2,1-17,1) [N=38]	12,6 (8,9-15,8) [N=191]	0,092	-
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	18,8 (4,8-35,2) [N=21]	23,4 (8,0-47,7) [N=147]	0,519	-
Sintomático	12 (22,6)	116 (52,3)	<0,001	0,26 (0,13-0,54) p<0,001
Síntomas cutáneos	8/12 (66,7)	51/116 (44,0)	0,133	-
Síntomas digestivos	8/12 (66,7)	50/116 (43,1)	0,119	-
Síntomas respiratorios	3/12 (25,0)	24/116 (20,7)	0,716	-
Tratamiento específico	36 (67,9)	164 (73,5)	0,726	-
Caso confirmado	17 (32,1)	87 (39,0)	0,349	-
Enfermedad de Chagas	0/22**	29/129** (24,8)	0,008	-
Alguna PCR de Chagas positiva	-	4/28*** (14,3)	-	-
Comorbilidad general	23 (43,4)	67 (30,4)	0,073	-
Alcoholismo	4 (7,7)	18 (9,3)	1,000	-
Eosinofilia absoluta o relativa	23 (43,4)	149 (66,8)	0,002	0,30 (0,16-0,59) p<0,001
Eosinofilia moderada-grave****	7/20 (35,0)	54/134 (40,3)	0,651	-
Recuento de eosinófilos [células/ μ L], mediana (IQR)	200 (100-900)	600 (200-1000)	0,001	-
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	3,6 (1,2-12,8)	8,1 (3,0-14,2)	0,006	-
Niveles de IgE [kU/L], mediana (IQR)	2544 (89-5000) [N=2]	544 (201-544) [N=57]	0,834	-
Índex serológico [S/CO], mediana (IQR)	2,1 (1,5-3,7) [N=51]	2,9 (1,8-5,5) [N=216]	0,020	-

* Del total de inmigrantes, excluidos los viajeros (N=263).

** Del total de inmigrantes latinoamericanos con *screening* de Chagas realizado (N=151).

*** A un paciente con enfermedad de Chagas no se le realizó ninguna PCR.

**** Del total de pacientes con eosinofilia absoluta (N=154).

Tabla 25. Análisis univariante y multivariante: casos sintomáticos vs. casos asintomáticos.

Variable, n (%)	Sintomáticos [N=128]	Asintomáticos [N=147]	p valor	Análisis multivariante OR (IC95%) p valor
Género masculino	51 (39,8)	83 (56,5)	0,006	0,56 (0,35-0,95) p=0,033
Edad [años], media (±SD)	44,5 (±14,5)	43,3 (±13,2)	0,482	-
Inmigrante	116 (90,6)	146 (99,3)	0,001	0,06 (0,01-0,50) p=0,009
Origen latinoamericano*	101/116 (87,1)	111/146 (76,0)	0,024	-
Tiempo de estancia en España* [años], mediana (IQR)	12,9 (9,3-16,0) [N=106]	12,1 (7,0-15,3) [N=126]	0,105	-
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	24,9 (7,7-52,3) [N=86]	19,5 (8,3-36,7) [N=82]	0,218	-
Inmunosupresión	12 (9,4)	41 (27,9)	<0,001	0,28 (0,13-0,58) p=0,001
Tratamiento específico	95 (74,2)	104 (70,7)	0,784	-
Caso confirmado	52 (40,6)	51 (34,7)	0,311	-
Enfermedad de Chagas	8/63** (12,7)	21/88** (23,8)	0,097	-
Alguna PCR de Chagas positiva	2/7*** (28,6)	2/21 (9,5)	0,253	-
Comorbilidad general	34 (26,6)	56 (38,1)	0,053	-
Alcoholismo	7 (6,3)	15 (11,2)	0,262	-
Eosinofilia absoluta o relativa	77 (60,2)	94 (64,0)	0,518	-
Eosinofilia moderada-grave****	32/68 (47,1)	29/85 (34,1)	0,104	-
Recuento de eosinófilos [células/μL], mediana (IQR)	500 (200-1050)	600 (200-1000)	0,937	-
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	7,4 (2,7-14,4)	7,5 (2,5-13,7)	0,580	-
Niveles de IgE [kU/L], mediana (IQR)	304 (165-1288) [N=44]	1120 (603-1760) [N=15]	0,068	-
Índex serológico [S/CO], mediana (IQR)	3 (1,7-5,3) [N=123]	2,6 (1,7-5,2) [N=144]	0,722	-

* Del total de inmigrantes, excluidos los viajeros (N=262).

** Del total de inmigrantes latinoamericanos con *screening* de Chagas realizado (N=151).

*** A un paciente con enfermedad de Chagas no se le realizó ninguna PCR.

**** Del total de pacientes con eosinofilia absoluta (N=153).

Tabla 26. Características sociodemográficas de los casos de estrongiloidiasis tratados y con seguimiento (N=59).

Variable, n (%)	Frecuencia [N=59]
Género masculino	26 (44,1)
Edad [años], mediana (IQR)	45,0 (38-57)
Inmigrante	57 (96,6)
Origen latinoamericano	49 (84,7)
Tiempo de estancia en España [años], mediana (IQR)	14,5 (9,6-17,6)
Viajero	2 (3,4)
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	20,9 (12,1-44,3)
Inmunosupresión	10 (17,0)
VIH	8/10 (80,0)
Caso confirmado	45 (76,3)
Síntomas	25 (42,3)
Clínica cutánea	16/25 (64,0)
Clínica gastrointestinal	14/25 (56,0)
Clínica respiratoria	3/25 (12,0)

❖ **Tasas de detección de las técnicas diagnósticas por muestra y paciente distribuida por año de estudio**

Tabla 27. Tasas de detección por paciente y año de las técnicas diagnósticas de *S. stercoralis* en pacientes con serología positiva (N=258).

Tasas de detección por paciente (%)	Jun-Dic 2013 n=15	2014 n=35	2015 n=39	2016 n=95	2017 n=42	Ene-Oct 2018 n=32	Total N=258
VD	1/15 (6,6)	1/34 (2,9)	5/39 (12,8)	7/94 (7,4)	6/41 (14,3)	1/32 (3,1)	21/256 (7,8)
APC	2/9 (22,2)	3/20 (15,0)	10/29 (34,5)	21/89 (23,6)	20/39 (51,3)	13/30 (43,3)	69/216 (31,9)
RT-PCR	0	0	2/2 (100)	10/44 (22,7)	9*/18 (50,0)	4/15 (26,7)	25/79 (31,6)

* Uno de los pacientes con RT-PCR positiva tenía APC realizado y positivo.

Tabla 28. Tasas de detección por muestra y año de las técnicas diagnósticas de *S. stercoralis* en pacientes con serología positiva (N=258).

Tasas de detección por muestra (%)	Jun-Dic 2013	2014	2015	2016	2017	Ene-Oct 2018	Total
VD	2/36 (5,6)	2/83 (2,4)	9/110 (8,2)	12/276 (4,3)	15/119 (12,6)	2/91 (2,2)	42/715 (5,8)
APC	3/16 (18,8)	6/40 (15,0)	20/66 (30,3)	39/247 (15,8)	38/104 (36,5)	32/86 (37,2)	138/559 (24,7)

❖ Tablas adicionales y curvas ROC

Tabla 29. Sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas evaluadas en función de distintos puntos de corte hipotéticos.

Puntos de corte	CrAg-ELISA (Gold-estándar primario)		Puntos de corte	CrAg-ELISA (Gold-estándar compuesto)	
	Sensibilidad	Especificidad		Sensibilidad	Especificidad
0,60	94,7	61,4	0,60	90,4	74,4
1,00	94,7	70,5	1,00*	89,2	88,0
2,40	78,9	95,5	2,40	56,6	97,6
3,55*	73,7	97,7	3,55	42,2	99,2
4,90	52,6	100,0	4,90	28,9	99,2
Puntos de corte	NIE-ELISA (Gold-estándar primario)		Puntos de corte	NIE-ELISA (Gold-estándar compuesto)	
	Sensibilidad	Especificidad		Sensibilidad	Especificidad
0,76	84,3	89,3	0,76*	84,3	89,3
1,12	78,9	85,1	1,12	69,9	93,6
2,10*	78,9	93,6	2,10	43,4	97,9
3,14	63,2	97,9	3,14	31,3	91,3
6,40	42,1	97,9	6,40	19,3	100,0

* Puntos de corte óptimos.

Tabla 30. Valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) en función de distintos niveles de prevalencia.

Prevalencia	CrAg-ELISA (Gold-estándar primario)		CrAg-ELISA (Gold-estándar compuesto)	
	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
1,0%	3,3 (2,1-5,3)	99,9 (99,5-99,9)	7,7 (4,9-12,0)	99,9 (99,8-99,9)
5,0%	15,3 (10,1-22,5)	99,6 (97,5-99,9)	30,5 (21,2-41,5)	99,4 (98,8-99,7)
10,0%	27,6 (19,1-37,9)	99,2 (94,8-99,9)	48,0 (36,3-60,0)	98,7 (97,5-99,3)
30,0%	59,5 (47,7-70,2)	96,9 (82,5-99,5)	78,1 (68,7-85,3)	95,0 (91,2-97,3)
50,0%	77,4 (68,1-84,6)	93,2 (66,9-98,9)	89,3 (83,7-93,1)	89,2 (81,6-93,9)
Prevalencia	NIE-ELISA (Gold-estándar primario)		NIE-ELISA (Gold-estándar compuesto)	
	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
1,0%	5,1 (2,5- 9,9)	99,7 (99,4- 99,9)	10,2 (5,6-17,8)	99,7 (99,6-99,8)
5,0%	21,8 (11,9-36,5)	98,7 (96,9-99,5)	37,2 (23,7-53,0)	98,5 (97,8-98,9)
10,0%	37,1 (22,2-54,8)	97,3 (93,8-98,2)	55,5 (39,6-70,4)	96,8 (95,5-97,7)
30,0%	69,4 (52,5- 82,4)	90,4 (79,7- 95,8)	82,8 (71,6-90,2)	88,7 (84,7-91,8)
50,0%	84,1 (72,0-91,6)	80,2 (62,7-90,7)	91,8 (85,5-95,5)	77,1 (70,4-82,7)

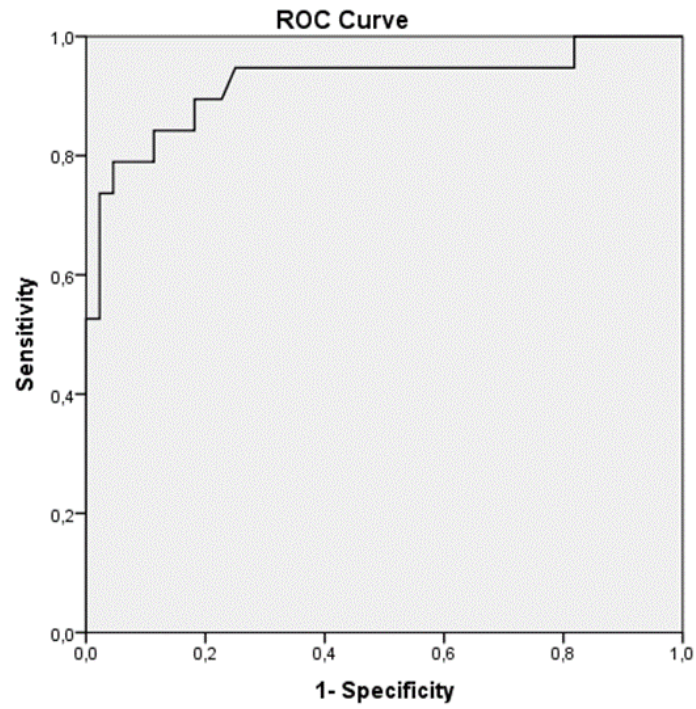


Figura 30. CrAg-ELISA (Gold-estándar primario); AUC=0,920.

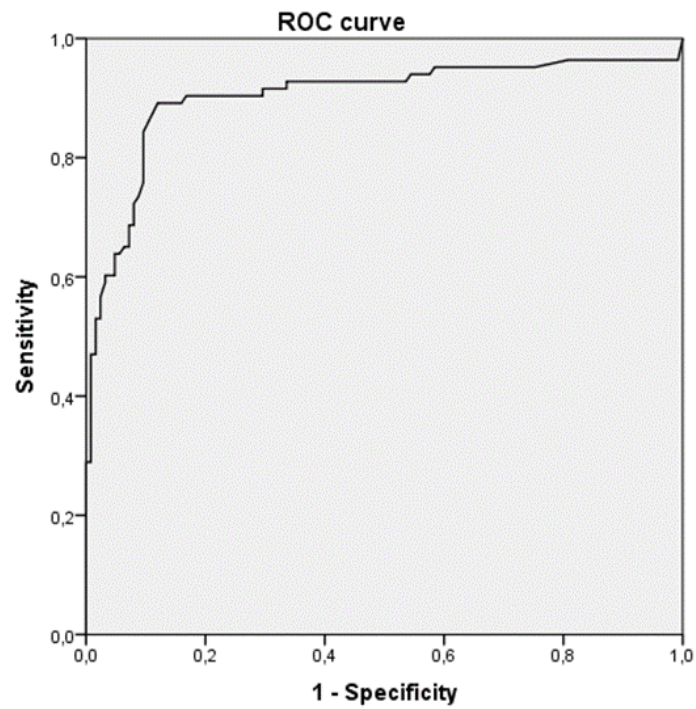


Figura 31. CrAg-ELISA (Gold-estándar compuesto); AUC=0,903.

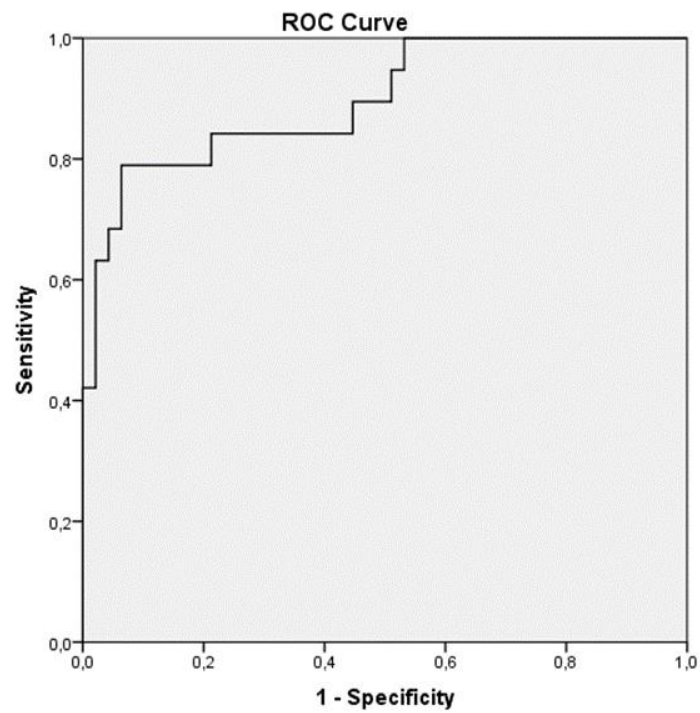


Figura 32. NIE-ELISA (Gold-estándar primario); AUC=0,897.

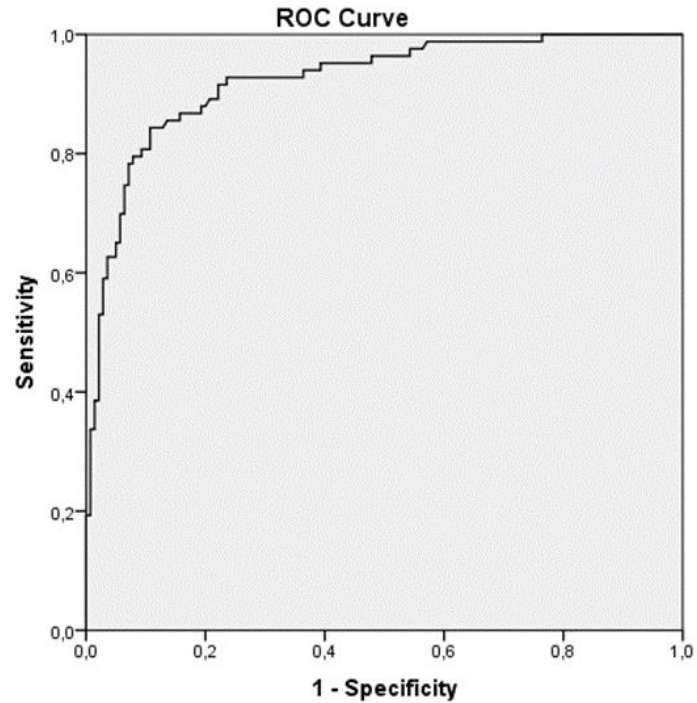


Figura 33. NIE-ELISA (Gold-estándar compuesto); AUC=0,923.

Tabla 31. Descriptivos de los pacientes con APC positivo y análisis univariante en función del TTP medio <3.

Variable, n (%)	Total [N=75]	Pacientes con TTP medio <3 [N=15]	Pacientes con TTP medio ≥3 [N=60]	p valor
Género masculino	40 (53,3)	9 (60,0)	31 (51,7)	0,773
Edad [años], media (± SD)	46,4 (±14,1)	48,8 (±17,7)	45,7 (±13,2)	0,460
Inmigrante	72 (96,0)	15 (100,0)	57 (95,0)	1,000
Origen latinoamericano*	62 (82,7)	14 (93,3)	48 (84,2)	0,363
Tiempo de estancia en España* [años], mediana (IQR)	13,0 (8,9-15,7) [N=67]	11,8 (8,5-15,1) [N=14]	12,9 (8,9-15,8) [N=53]	0,541
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	21,4 (10,8-37,3) [N=52]	20,4 (12,0-33,0) [N=9]	23,7 (10,8-38,5) [N=43]	0,952
Sintomático	37 (49,3)	11 (73,3)	26 (43,3)	0,047
Síntomas cutáneos	19/37 (51,4)	4/11 (36,4)	15/26 (57,7)	0,295
Síntomas digestivos	23/37 (62,2)	8/11 (72,7)	15/26 (57,7)	0,477
Síntomas respiratorios	5/37 (13,5)	0 (0)	5/26 (19,2)	0,295
Inmunosupresión	12 (16,0)	3 (20,0)	9 (15,0)	0,697
Alcoholismo	9/69 (13,0)	3 (4,3)	6 (8,7)	0,396
Visualización directa positiva	18 (24,0)	5 (33,3)	13 (21,7)	0,335
Eosinofilia absoluta o relativa	69 (92,0)	14 (93,3)	55 (91,7)	1,000
Eosinofilia moderada-grave**	34 (51,5)	8 (66,7)	26 (48,2)	0,342
Recuento de eosinófilos [células/μL], mediana (IQR)	1000 (700-1350)	1100 (600-1100)	1000 (800-1400)	0,873
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	14,3 (9,5-18,9)	13,6 (8,5-18,6)	14,5 (10,2-19,1)	0,822
Niveles de IgE I [kU/L], mediana (IQR)	842 (259-2165) [N=16]	1748 (116-4140) [N=4]	842 (288-1600) [N=12]	1,000
Índex serológico [S/CO], mediana (IQR)	4,8 (2,7-8,5) [N=69]	5,1 (2,2-8) [N=14]	4,6 (2,8-8,7) [N=55]	0,709

* Del total de pacientes inmigrantes (N=72).

** Del total de pacientes con eosinofilia absoluta (N=69).

Anexo 2. Producción científica

A2.1. Comunicaciones presentadas en congresos

- ❖ XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Barcelona, mayo 2016; comunicación oral)

CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Seimc
Barcelona
26-28 mayo 2016

Dificultades diagnósticas de *Strongyloides stercoralis*

Análisis de técnicas parasitológicas y serológicas utilizadas en el Hospital 12 de Octubre

I. Fradejas¹, L. Corbella², A. Martín-Díaz¹, J.M. Herrero-Martínez², M. Lizasoain², A.M. Ruiz-Cue¹,
M.J. Babiano¹, A. Pérez-Ayala¹.

¹Servicio de Microbiología; ²Servicio de Medicina Interna y Unidad de Enfermedades
Infecciosas;
Hospital 12 de Octubre, Madrid

Hospital Universitario
12 de Octubre
SaludMadrid
Comunidad de Madrid

CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Seimc
Barcelona
26-28 mayo 2016


Introducción


Población inmigrante y refugiada
Viajeros a países tropicales
Población inmunosuprimida

Objetivos


- ❖ Conocer la situación actual del diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* en el H120
- ❖ Analizar las técnicas utilizadas y la concordancia entre ellas
- ❖ Ver las posibles mejoras que se podrían implantar en el diagnóstico de rutina del parásito.

Hospital Universitario
12 de Octubre
SaludMadrid
Comunidad de Madrid


CONGRESO NACIONAL
 SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES
 INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA


seimc

Barcelona
 26-28 mayo 2016




Material y métodos


- ❖ Estudio retrospectivo de Enero 2013-Julio 2015
- ❖ Pacientes con al menos una **positiva**:
 - ☐ Visualización directa (VD) de **concentrado** de heces.
 - ☐ Técnica **agar-cultivo** (AC) en heces.
 - ☐ **ELISA** (SciMedx Corporation, Denville, NJ). S=85,5%; E=82,6%


Clasificación de los pacientes


Casos confirmados	VD+ y/o AC+
Casos no confirmados	Pacientes con ELISA+ y VD/AC - o NR


Casos probables	ELISA+ y FR epidemiológico
Falsos positivos	Sin FR epidemiológico y/o ELISA- de seguimiento sin tto



Hospital Universitario
 12 de Octubre
 SaludMadrid
Comunidad de Madrid

 Técnica diagnóstica


 Factores de Riesgo

 Tratamiento y seguimiento


CONGRESO NACIONAL
 SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES
 INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA


seimc

Barcelona
 26-28 mayo 2016




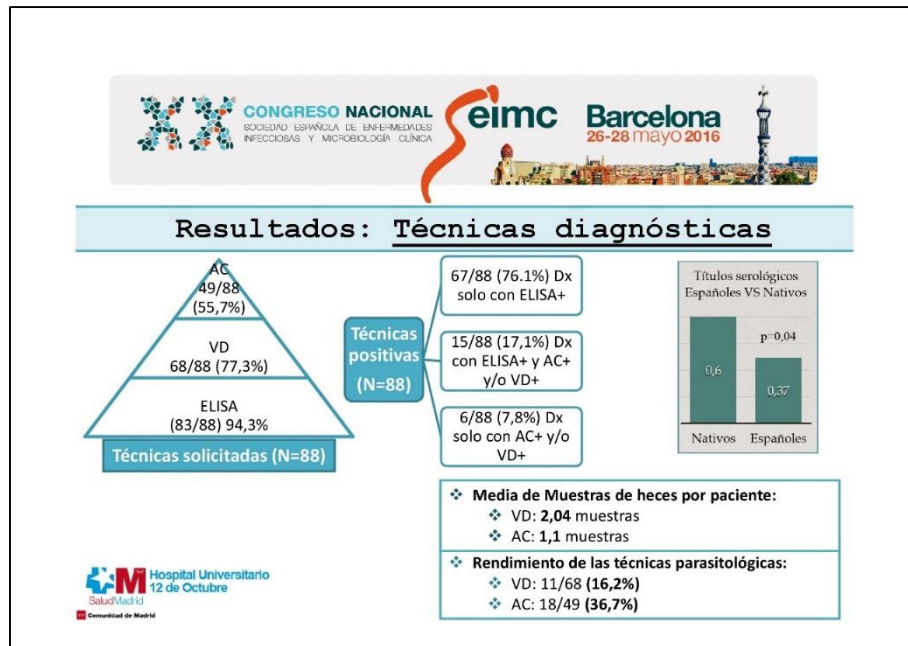
Resultados: Demográficos

- ❖ 107 pacientes
 - ☐ 21 Casos confirmados
 - ☐ 86 Casos no confirmados
 - ☐ 67/86: Casos probables
 - ☐ 19/86: Falsos positivos

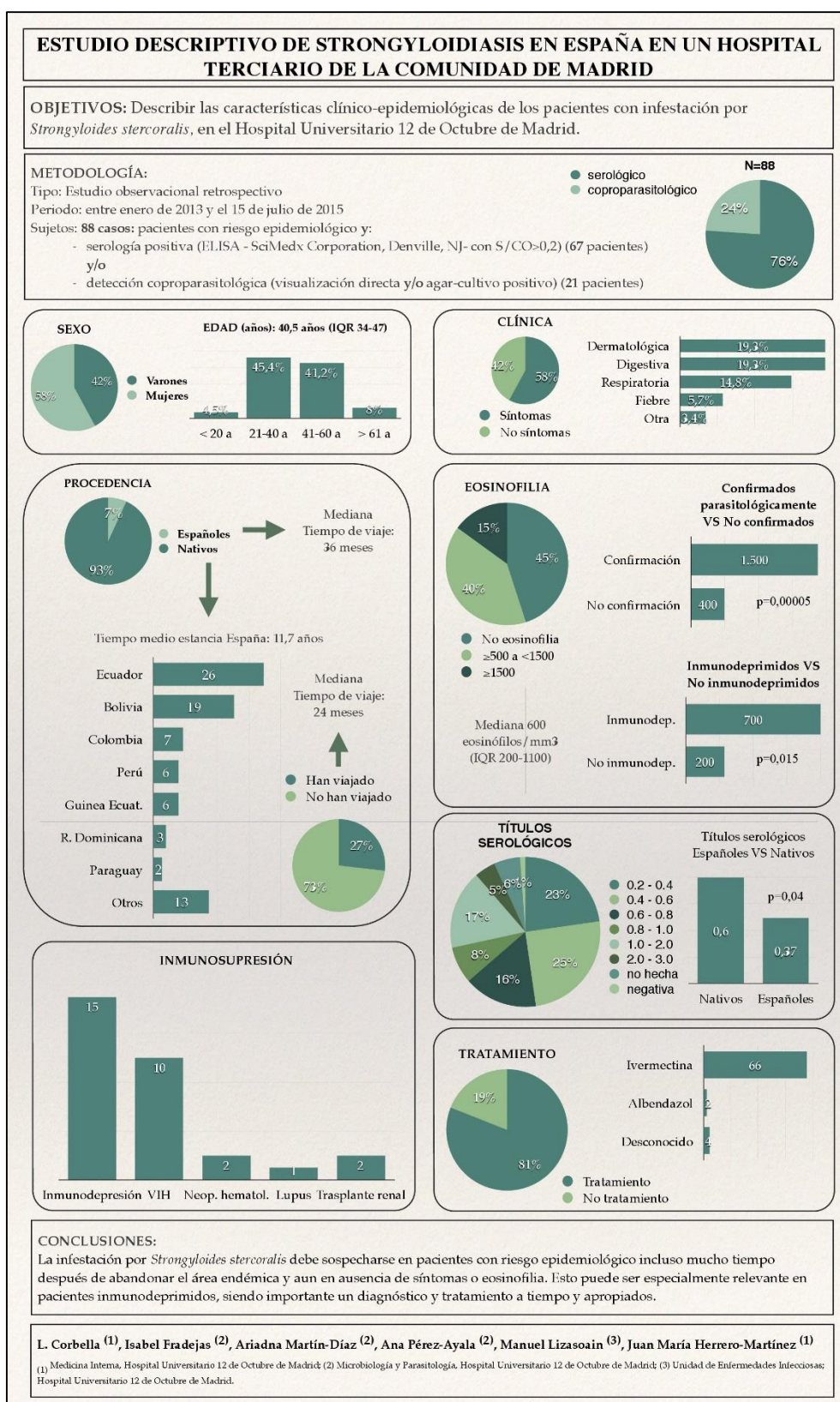
88 casos de Estrongioloidiasis

- ✓ 57,9% mujeres
- ✓ Mediana edad: 40,5 años (8-77)
- ✓ 93,2% inmigrantes (76,1% Latinoamérica)
- ✓ 6,8% españoles con FR epidemiológico

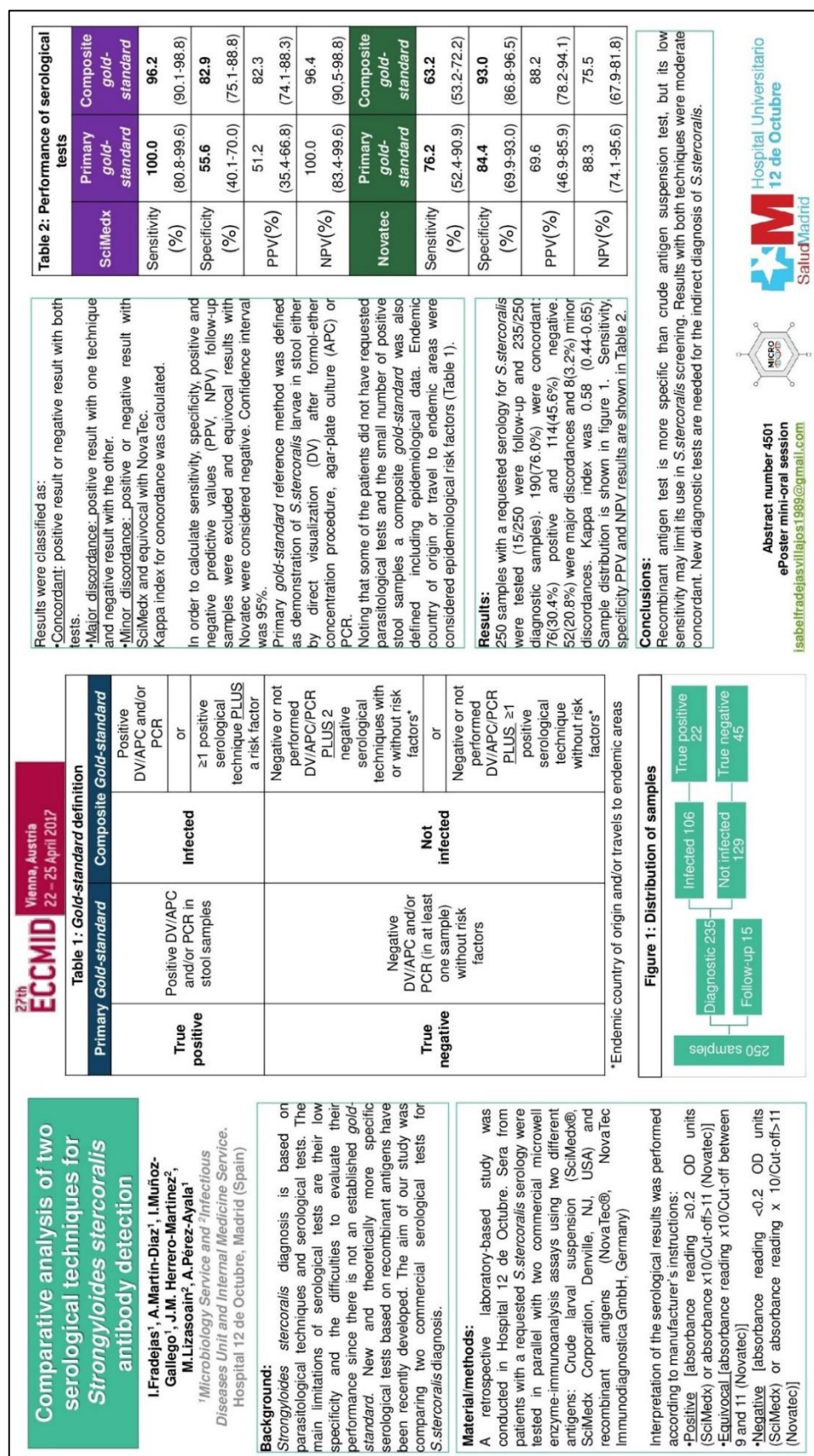

Hospital Universitario
 12 de Octubre
 SaludMadrid
Comunidad de Madrid



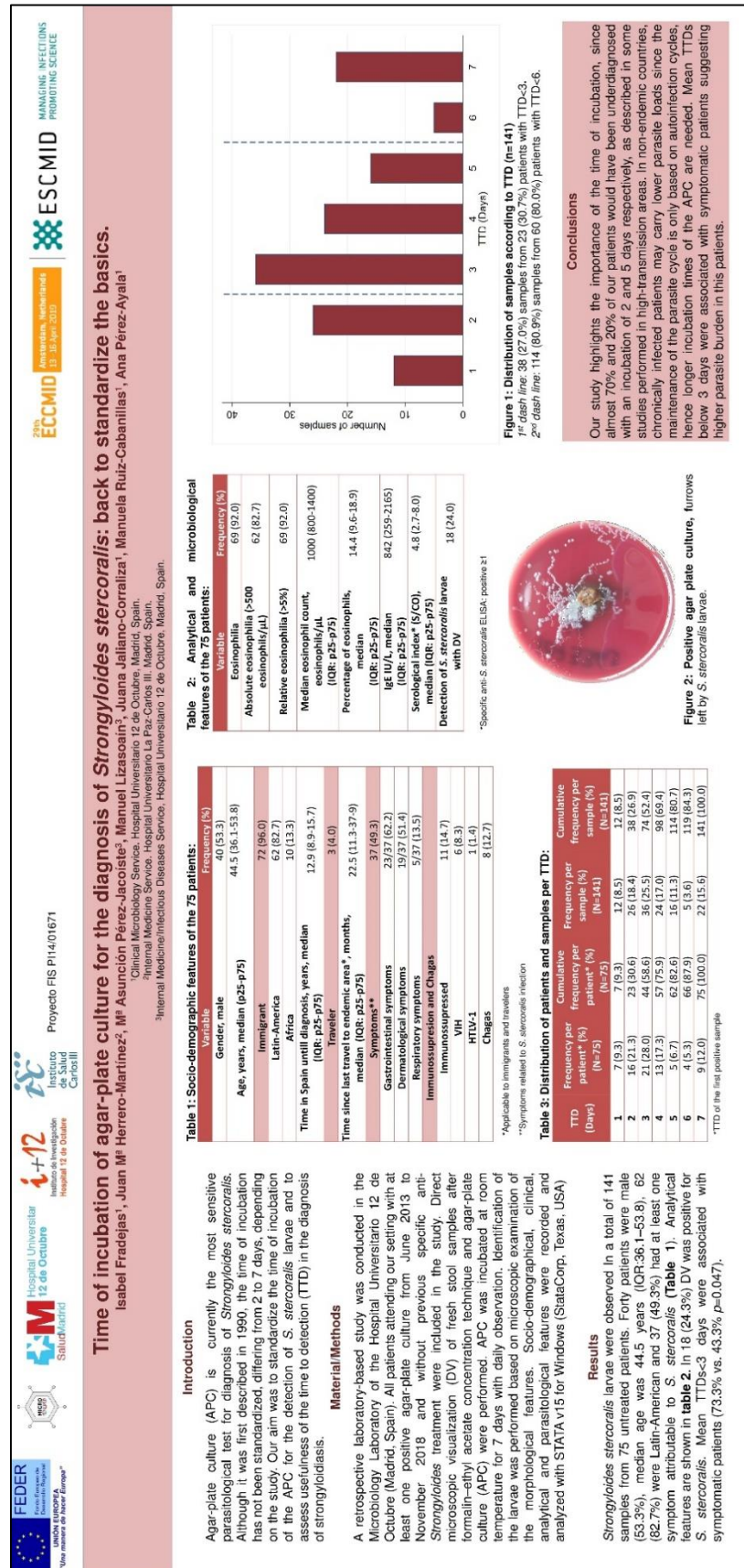
❖ XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Barcelona, mayo 2016; comunicación tipo póster)



❖ 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
(Viena, abril 2017; comunicación tipo póster discutido)



❖ 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Ámsterdam, abril 2019; comunicación tipo póster)



❖ XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Madrid, mayo 2019; comunicación tipo póster)

Hospital Universitario 12 de Octubre
SaludMadrid

i+12
Instituto de Investigación
Hospital 12 de Octubre

Presentación 0431
Contacto: isabelfradejasvillajos1989@gmail.com

XXIII CONGRESO NACIONAL
Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y
Microbiología Clínica

MADRID
PALACIO DE CONGRESOS
23-28 MAYO 2019

Estrongiloidiasis en un área no endémica: Estudio clínico-microbiológico de casos de infección por *Strongyloides stercoralis* en un periodo de 5 años en un hospital de tercer nivel

Isabel Fradejas¹, Juan M^o Herrero-Martínez², Manuel Lizasoain³, Juana Jaliano-Corraliza¹, Manuela Ruiz-Cabanillas¹, Ana Pérez-Ayala¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre. ²Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz/Carlos III. ³Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario 12 de Octubre.

Introducción y Objetivos

La estrongiloidiasis es una de las enfermedades tropicales más desconocidas, ya que en la mayoría de los casos causa infecciones asintomáticas y no se suele realizar una búsqueda activa. El diagnóstico y tratamiento de la infección por *Strongyloides stercoralis* (Ss) es esencial no solo porque puede causar cuadros graves en inmunosuprimidos sino también por razones de Salud Pública. El objetivo del estudio fue analizar la incidencia y describir las características epidemiológicas, clínicas y analíticas de los casos de estrongiloidiasis diagnosticados en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, España).

Material y Métodos

Estudio observacional retrospectivo en el que se incluyeron pacientes con al menos una técnica diagnóstica de Ss positiva [Serología, visualización directa del concentrado de heces, agar-cultivo y/o RT-PCR en heces] entre junio de 2013 y octubre de 2018. Los pacientes se clasificaron como: casos confirmados (detección de Ss en heces por técnicas parasitológicas o detección por RT-PCR en heces con algún factor de riesgo epidemiológico [continente de origen endémico y/o viajes a área endémica]) y probables (serología positiva sin detección de larva en heces y con factores de riesgo epidemiológicos). Se analizaron tasas de incidencia, variables demográficas, clínicas y analíticas. Se realizó análisis univariante por subgrupos (Confirmados vs. no confirmados, inmunosuprimidos vs. inmunocompetentes) con STATA v15 para Windows.

Resultados

Se incluyeron 276 pacientes: 104(37,7%) casos confirmados y 172(62,3%) probables. Las tasas de incidencia por año se muestran en la **Tabla 1**. El 48,9% eran hombres, con una mediana de edad de 43,5 años (IQR: 35,5-52,5). De ellos, 263 (95,3%) eran inmigrantes, siendo Latinoamérica el continente de origen mayoritario (213/263). Trece pacientes (4,7%) fueron europeos que habían realizado viajes a área endémica. La mediana de tiempo hasta diagnóstico fue 12,5(IQR: 8,3-15,8) años. El Servicio que solicitó el diagnóstico principalmente fue Medicina Interna/Infecciosas (55,8%) seguido de Alergia (18,5%). En cuanto al estado inmunitario, 53 (19,2%) eran pacientes con algún tipo de inmunosupresión, siendo el VIH (34/53) la causa principal. Un paciente era HTLV-1 positivo. El 27,1% de los pacientes tuvo alguna comorbilidad no infecciosa, siendo la hipertensión arterial y la diabetes las principales enfermedades (17/75). En relación a enfermedades infecciosas distintas a la estrongiloidiasis, 29 pacientes (10,5%) estaban diagnosticados de Enfermedad de Chagas y en 26 (9,4%) se detectaron otros parásitos intestinales aparte de Ss. El motivo de consulta principal fue la eosinofilia (22,2%) seguido de los síntomas cutáneos (12,7%). El 62,3% de los pacientes tuvo eosinofilia relativa o absoluta. De los 276 pacientes, 128 (46,6%) tenían síntomas sugerentes de infección por *Strongyloides*, siendo la clínica cutánea la mayoritaria (59/128), seguida de la digestiva (58/128). No se detectó ningún caso de hiperinfección/ infección diseminada. En 200 (75,2%) pacientes se prescribió tratamiento antihelmíntico específico, siendo la ivermectina el principal fármaco administrado (189/200). El análisis univariante completo y las técnicas diagnósticas utilizadas se muestran en las **Tablas 2 y 3** respectivamente.

Larvas rabaditiforme (A) y filariforme (B y C) observadas en agar-cultivo

Tabla 1: Tasas de incidencia (número de casos/100.000 habitantes) por año de diagnóstico.

Año	Población atendida	Nº de casos	Tasa de incidencia
Jun-Dic 2013	427.401	21	4,91
2014	428.442	39	9,10
2015	431.325	38	8,81
2016	434.541	97	22,32
2017	439.489	47	10,69
Ene-Oct 2018	No disponible	34	-

Tabla 2: Análisis univariante por subgrupos [N=276]

Variable, n (%)	Casos confirmados [N=104]	Casos probables [N=172]	p valor	Inmunosuprimidos [N=53]	Inmunocompetentes [N=223]	p valor
Género masculino	56 (53,9)	79 (45,9)	0,202	34 (64,2)	101 (45,3)	0,014
Edad [años], media (±SD)	47,2 (±14,3)	41,8 (±13,0)	0,001	41,9 (±13,8)	44,2 (±13,7)	0,253
Inmigrante	101 (97,1)	162 (94,2)	0,382	51 (96,2)	212 (95,1)	1,000
Origen latinoamericano*	88/101 (87,1)	125/162 (77,2)	0,045	34/51 (66,7)	179/212 (84,4)	0,004
Tiempo de estancia en España* [años], mediana (IQR)	13,0 (8,9-16,5) [N=91]	12,1 (7,6-15,2) [N=138]	0,187	10,1 (2,1-17,1) [N=38]	12,6 (8,9-15,8) [N=191]	0,092
Tiempo desde último viaje a área endémica [meses], mediana (IQR)	23,7 (10,7-47,7) [N=69]	21,9 (4,0-44,7) [N=99]	0,508	18,8 (4,8-35,2) [N=21]	23,4 (8,0-47,7) [N=147]	0,519
Sintomático	52 (50,5)	76 (44,2)	0,311	12 (22,6)	116 (52,3)	<0,001
Síntomas cutáneos	26/52 (50,0)	33/76 (43,4)	0,463	8/12 (66,7)	51/116 (44,0)	0,133
Síntomas digestivos	31/52 (59,6)	27/76 (35,5)	0,007	8/12 (66,7)	50/116 (43,1)	0,119
Síntomas respiratorios	7/52 (13,5)	20/76 (26,3)	0,080	3/12 (25,0)	24/116 (20,7)	0,716
Inmunosupresión	17 (16,4)	36 (20,9)	0,349	-	-	-
Eosinofilia absoluta o relativa	87 (83,7)	85 (49,4)	<0,001	23 (43,4)	149 (66,8)	0,002
Eosinofilia moderada-grave**	42 (51,2) [N=82]	19 (26,4) [N=72]	0,002	7/20 (35,0)	54/134 (40,3)	0,651
Recuento de eosinófilos [cél./μL], mediana (IQR)	1000 (500-1250)	400 (100-800)	<0,001	200 (100-900)	600 (200-1000)	0,001
Porcentaje de eosinófilos, mediana (IQR)	12,8 (7,6-18,6)	4,4 (1,8-10,9)	<0,001	3,6 (1,2-12,8)	8,1 (3,0-14,2)	0,006
Niveles de IgE I [kU/L], mediana (IQR)	603 (253-1830) [N=19]	510 (165-1398) [N=40]	0,307	2544 (89-5000) [N=2]	544 (201-544) [N=57]	0,834
Índice serológico [S/CO], mediana (IQR)	4,5 (2,5-8,0) [N=95]	2,2 (1,4-3,7) [N=172]	<0,001	2,1 (1,5-3,7) [N=51]	2,9 (1,8-5,5) [N=216]	0,020

*Del total de la población inmigrante (N=263).
** Del total de pacientes con eosinofilia absoluta (N=154).

Tabla 3: Técnicas diagnósticas utilizadas en la población de estudio.

Variables de diagnóstico	Frecuencia (%) [N=276]
Diagnóstico serológico	
Serología de <i>Strongyloides</i> realizada	268 (97,1)
Serología de <i>Strongyloides</i> positiva	267/268 (99,6)
Índice serológico [S/CO*], mediana (IQR**)	2,8 (1,7-5,3)
Diagnóstico parasitológico y molecular	
Casos confirmados solo con VD***	7 (0,4)
Casos confirmados solo con APC****	57 (20,6)
Casos confirmados con VD y APC	18 (6,5)
Casos confirmados solo con RT-PCR	22 (8,0)

*Signal/Cut-off. Positivo≥2.
**Rango intercuartílico.
***Visualización directa del concentrado.
****Cultivo en placa de agar (agar-cultivo).

Conclusiones

La incidencia de estrongiloidiasis ha aumentado en nuestro medio alcanzando un máximo en el año 2016. Pacientes de mayor edad, de origen latinoamericano, con clínica gastrointestinal, y con niveles de eosinófilos e índice serológicos altos se asociaron con detección del parásito en heces. Hombres de origen africano con menos síntomas, cifras de eosinófilos e índice serológicos bajos se asociaron con inmunosupresión. El screening de Ss debería realizarse adecuadamente tanto en pacientes sintomáticos y asintomáticos con exposición potencial al parásito, especialmente en inmunosuprimidos ya que, aunque suelen ser menos sintomáticos y presentan menos eosinofilia, pueden desarrollar cuadros graves.

A2.2. Artículos publicados

Trans R Soc Trop Med Hyg 2018; **00**: 1–7
doi:10.1093/trstmh/try101



Comparative study of two commercial tests for *Strongyloides stercoralis* serologic diagnosis

Isabel Fradejas^{a,*}, J. M. Herrero-Martínez^b, Manuel Lizasoain^b, Esperanza Rodríguez de las Parras^c and Ana Pérez-Ayala^a

^aDepartment of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain; ^bInternal Medicine and Infectious Diseases Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ^c Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Pozuelo 28, Majadahonda, 28222 Madrid, Spain

*Corresponding author: Tel: +34 917792411; E-mail: isabelfradejasvillajos1989@gmail.com

Received 21 July 2018; revised 15 August 2018; editorial decision 16 August 2018; accepted 16 August 2018

Background: Serological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* is often limited by its low specificity due to cross-reactivity with other parasitic nematodes. Novel serological tests assumed to be more specific have been recently developed. The aim of our study was to compare two commercial tests based on different antigens for *S. stercoralis* diagnosis in humans from a non-endemic area.

Methods: A retrospective laboratory-based study was conducted in the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. Samples from patients with a requested *S. stercoralis* serology from January 2013 to October 2016 were tested with two commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests (crude larval suspension ELISA [CrAg-ELISA] and recombinant antigen ELISA [NIE-ELISA]). Sensitivity, specificity and predictive values were calculated using primary and composite gold standards. The κ index was calculated.

Results: A total of 249 samples from 233 patients were tested ($\kappa=0.735$). The CrAg-ELISA yielded sensitivities from 89.2% (95% confidence interval [CI] 80.7 to 94.2) to 94.7% (95% CI 75.4 to 99.0) and the NIE-ELISA from 72.3% (95% CI 58.2 to 83.1) to 78.9% (95% CI 56.7 to 91.5). Specificity ranged from 72.3% (95% CI 58.2 to 83.1) to 89.3% (95% CI 83.1 to 93.4) for the CrAg-ELISA and from 85.1% (95% CI 72.3 to 92.6) to 93.6% (95% CI 88.2 to 96.6) for the NIE-ELISA.

Conclusions: The NIE-ELISA is more specific than the CrAg-ELISA, but its low sensitivity limits its use in *S. stercoralis* screening. New diagnostic tests are needed for the diagnosis of *S. stercoralis*.

Keywords: immigrant health, NIE-ELISA, parasitological tests, serological diagnosis, soil-transmitted helminths, strongyloidiasis

Introduction

Strongyloides stercoralis is a globally distributed intestinal nematode transmitted by skin penetration of infective larvae present in contaminated soil. Poor socio-economic conditions, especially in tropical countries, contribute to the maintenance of its transmission.¹ In spite of being a neglected tropical disease,² human strongyloidiasis is an increasing problem in developed countries.^{3,4} In this scenario, travellers and immigrants from tropical areas are the most commonly affected patients.³ Although most cases are lifelong asymptomatic infections, immunocompromised patients can develop life-threatening outcomes,^{5,6} so an early diagnosis and treatment is required. *S. stercoralis* diagnosis remains a challenge since there is not a gold-standard reference method. Faecal tests are not sensitive enough to be used as

screening tests,^{7,8} thus serological tests are usually requested to diagnose the infection. Antibody detection in the routine diagnosis is frequently performed with commercial tests based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Other methodologies such as the luciferase immunoprecipitation system (LIPS)⁹ and immunofluorescence antibody test (IFAT)¹⁰ show better sensitivity and specificity, but their use is usually restricted to research in reference laboratories. Until 2014, all commercial ELISAs used crude parasite suspension as the antigen (CrAg),¹¹ however, cross-reactivity with other parasites has been described.^{12–15} This becomes a problem due to the co-endemicity of both parasites and the different patient management required.¹⁶ ELISAs using more specific antigens, such as recombinant antigen (NIE),¹⁷ have become commercially available, thus there is a need to evaluate this diagnostic test in clinical settings.

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

1 of 7

ORIGINAL ARTICLE

academic.oup.com/trstmh/advance-article-abstract/doi/10.1093/trstmh/try101/5096880 by St Francis Xavier University user on 16 September 2018

I. Fradejas et al.

The aim of this study was to evaluate the performance and the diagnostic accuracy of two commercial serological tests using different antigens for *S. stercoralis* diagnosis and their use in the routine screening of strongyloidiasis in a non-endemic area.

Materials and methods

Study design

A retrospective laboratory-based study was performed on archived serum samples from patients with a requested detection of specific antibodies for *S. stercoralis* in the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Participants and setting

All patients attending the Hospital Universitario 12 de Octubre from January 2013 to October 2016 with a requested serology for *S. stercoralis* were included in the study. Our hospital is a 1300-bed referral hospital for the southern area of Madrid attending a large number of patients potentially exposed to *S. stercoralis*. In our setting, screening for strongyloidiasis is requested by the allergy, internal medicine, dermatology and gastroenterology departments in immigrants from endemic areas (Africa, Asia and South America) and European patients with a history of travel to endemic countries with gastrointestinal, cutaneous or respiratory symptoms that could be related to *S. stercoralis* infection with or without eosinophilia (>500 cells/ μ l) and in asymptomatic immigrants or European patients with a history of travel to endemic areas prior to immunosuppressive therapies, those who are human immunodeficiency virus (HIV) positive and/or haemato-oncologic patients. In some selected cases, *S. stercoralis* diagnosis is also requested in European patients without a history of travel to endemic countries but with gastrointestinal, cutaneous or respiratory symptoms (with or without eosinophilia) that could be related to *Strongyloides* and no other confirmed diagnosis. For the purpose of our study, all patients with a requested *Strongyloides* serology, regardless of the reason for consultation, were consecutively included.

Demographic data (age at diagnostic and sex), HIV serostatus, epidemiological risk factors (continent of origin and travel to endemic countries), serological index and parasitological and molecular test results were included. These data were determined by review of the patients' clinical records.

Study samples

Serum samples from the above-mentioned patients were included. The samples were routinely processed using the commercial CrAg test and then stored at -40°C . These samples were retrospectively retested with the NIE test. Screening and follow-up samples were included. The screening sample was defined as the first sample from a patient who had never been serologically screened for *Strongyloides*. The follow-up sample was defined as the second sample collected from a patient with a positive result in a previous sample.

Test methods

Diagnostic tests

Serological diagnosis

The evaluated tests are two commercial microwell ELISAs. They were performed as follows:

- CrAg-ELISA (SciMedx; SciMedx, Denville, NJ, USA): This is a routine serological test used in our laboratory for detection of anti-*S. stercoralis* antibodies. A manual protocol of ELISA was performed in microtitre plates coated with crude larval suspension. Testing was performed by qualified staff according to the manufacturer's instructions. Colorimetric reading of the results was carried out on a DS2 automated ELISA workstation (DYNEX; Magellan Biosciences, Chantilly, VA, USA). Interpretation of the results was positive (absorbance reading ≥ 0.2 optical density [OD] units) or negative (absorbance reading < 0.2 OD units). To simplify data analysis, results were expressed as an index (absorbance reading/0.2 OD units). Index results ≥ 1.0 were positive and < 1.0 were negative.
- NIE-ELISA (NovaLisa; NovaTec Immunodiagnostica, Dietzenbach, Germany): This is a microwell ELISA based on NIE antigen. Interpretation of the results was made according to the manufacturer's instructions: positive (absorbance/cut-off > 1.1), equivocal (absorbance reading/cut-off 0.9–1.1) and negative (absorbance reading/cut-off < 0.9). The test and interpretation of the results was performed by a DS2 automated ELISA workstation (DYNEX; Magellan Biosciences).

Based on the results of these two tests, samples were classified as positive concordance (positive result with both the CrAg-ELISA and NIE-ELISA), negative concordance (negative result with both the CrAg-ELISA and NIE-ELISA), major discordance (positive result with one technique and negative result with the other) and minor discordance (positive or negative result with CrAg-ELISA and equivocal result with the NIE-ELISA).

In addition to the serological testing described above, detection of specific isotypes immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG4 was performed in discordant samples by ELISA according to Rodrigues et al. (2007) using *Strongyloides venezuelensis* saline heterologous antigen.¹⁸

Parasitological tests

Detection of *S. stercoralis* larvae in the stool was based on direct microscopic visualization (DV) of stool samples and agar plate culture (APC). Following the recommendations of the Spanish Society of Infectious Diseases, three stool samples (collected on three different days) per patient were processed.¹⁹ Microscopic examination for the presence of larvae was performed using the formalin-ethyl acetate concentration technique in each stool sample, according to the standard routine procedures at the diagnostic laboratory of the hospital. The APC was carried out as previously described.¹⁹ These techniques were performed by well-trained staff in the Microbiology Laboratory of the Hospital Universitario 12 de Octubre.

Molecular methods

In some selected cases, molecular diagnosis with real-time polymerase chain reaction (PCR)²⁰ in stool samples was carried

Downloaded from https://academic.oup.com/itstm/advance-article-abstract/doi/10.1093/itstm/ty101/5096880 by St Francis Xavier University user on 16 September 2018

out to confirm a positive serological result without detection of larvae using parasitological techniques and with high clinical suspicion. These were performed at the National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain.

Gold-standard reference method

A primary gold standard was defined as demonstration of *S. stercoralis* larvae in stool either by parasitological or molecular methods in at least one sample per patient. Due to the retrospective design of the study, a significant number of the included patients did not have faecal tests requested. Noting this, and that there were a small number of positive stool samples, a composite gold standard was defined including serological results and epidemiological risk factors. Epidemiological risk factors were defined as endemic country of origin and/or travel to endemic countries. Thus patients were classified as follows:

- Primary gold standard: Patients with requested parasitological tests.
 - True positive: Detection of *S. stercoralis* larvae in the stool by any technique (DV after formalin-ethyl acetate concentration and/or by APC and/or by PCR) in at least one stool sample.
 - True negative: No detection of *S. stercoralis* larvae in stool samples of patients without potential exposure to the parasite (i.e., European patients who have never travelled to endemic countries).
- Composite gold standard: Patients with and without requested parasitological tests.
 - Infected (denominator for sensitivity): A positive faecal test (DV, APC and/or PCR in stool) or a positive result in at least one of the commercial serological tests plus an epidemiological risk factor.
 - Non-infected (denominator for specificity): Negative or not performed faecal tests and negative serological results with both techniques or a positive serological result with one or both commercial serological tests and without epidemiological risk factors.

Statistical analysis

Cohen's κ coefficient was performed to assess concordance between serological tests (including screening and follow-up samples) and between each serological test and both gold standards (including only screening samples).

Follow-up samples were excluded to calculate sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). Equivocal results with the NIE-ELISA were considered negative. Test accuracies were calculated using the manufacturer's cut-off levels and at hypothetical cut-off levels. Predictive values were calculated for different prevalence levels. Receiver operating characteristic (ROC) curves were developed against primary and composite gold standards, including diagnostic samples with the two tested techniques.²¹ The confidence interval (CI) for uncertainty was 95%. Data analysis was performed using SPSS version 20.0 for Windows (IBM, Armonk, NY, USA).

Results

Results are reported according to the Standards for Reporting Diagnostic Accuracy checklist (Supplementary material S2). A total of 249 serum samples from 233 patients with a requested *S. stercoralis* serology were tested in the study. Demographic data for the whole study population are shown in Table 1.

Of the 249 tested samples, 212 (85.1%) were concordant and 37 (14.9%) were discordant. The distribution of samples according to this classification is shown in Table 2. The κ coefficient for concordance between techniques was 0.735 (95% CI 0.647 to 0.822).

Isotypes were performed in 32 of 37 discordant samples. Only four were positive for IgG1, all of them being positive with the CrAg-ELISA and negative with the NIE-ELISA (i.e., major discordances). None of the 32 analysed samples was positive for IgG4. Of the 28 samples that were negative for IgG1 and IgG4, 17 were CrAg-ELISA positive (index range 1.00–5.70)/NIE-ELISA negative, 1 was CrAg-ELISA positive (index 1.00)/NIE-ELISA equivocal (index 0.93), 6 were CrAg-ELISA negative (index range 0–0.82)/NIE-ELISA equivocal (index range 0.91–1.06) and 4 were CrAg-ELISA negative/NIE-ELISA positive (index range 1.70–2.79).

Twenty-six of the 249 samples were follow-up samples and were excluded from the following diagnostic accuracy analysis. There were 223 diagnostic serological samples. Sixty-six patients (29.6%) were evaluated using the primary gold standard and 223 (100.0%) were evaluated using the composite gold standard (Figure 1). Eighty-three (37.2%) were considered infected based on the composite gold standard (19/83 were true positive based on the primary gold standard) and 140 (62.8%) were non-infected patients (47/140 were true negative based on the primary gold standard) (Table 3).

Faecal parasitological tests were performed in 177 of 223 (79.4%) patients. In all of them, DV (79.4%) was performed;

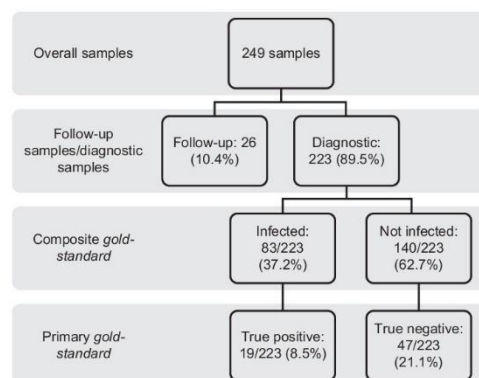
Table 1. Demographic and epidemiological data of the 233 patients

Variable	Values
Age, years, median (range)	44.8 (3.8–88.4)
Sex, male, n (%)	94 (40.3)
HIV positive, n (%)	28 (12.0)
Area of origin, n (%)	
Latin America	135 (57.9)
Europe	72 (30.9)
Africa	21 (9)
Asia	3 (1.3)
Unknown	2 (0.9)
Travels to endemic area (only in the 72 European patients), n (%)	
No travels	59 (81.9)
Latin America	4 (5.5)
Asia	6 (8.3)
Asia and Africa	1 (1.4)
Travels to unknown endemic area	2 (2.8)

I. Fradejas et al.

Table 2. Distribution of results (diagnostic and follow-up samples) according to concordance (N=249)

Concordant samples, n (%)		Discordant samples, n (%)			
Positive concordance	Negative concordance	Major discordance		Minor discordance	
		Positive CrAg-ELISA/ negative NIE-ELISA	Negative CrAg-ELISA/ positive NIE-ELISA	Negative CrAg-ELISA/ equivocal NIE-ELISA	Positive CrAg-ELISA/ equivocal NIE-ELISA
76 (30.5)	136 (54.6)	25 (10.0)	4 (1.6)	6 (2.4)	2 (0.8)


Figure 1. Classification of the samples according to the predefined gold standards.

APC and real-time PCR were carried out in 132 (59.2%) and 22 (9.9%) cases, respectively. The parasitological tests were positive for *S. stercoralis* in 5/177 (3.8%) with DV, 13/132 (9.8%) with APC and 6/22 (27.3%) with PCR. Fifteen of the 177 (8.5%) patients with a requested DV were co-infected with other gastrointestinal parasites: 7 *Entamoeba coli*, 4 *Blastocystis hominis*, 3 *Endolimax nana*, 2 *Entamoeba histolytica/dispar*, 1 *Iodamoeba bustchlii*, 1 *Giardia intestinalis* and 1 *Hymenolepis nana*. Hookworm and *Schistosoma* spp. eggs were not detected with faecal techniques in any patient.

Of the 19 cases with detection of *S. stercoralis* larvae in the stool (i.e., true positives with primary gold standard), 14 were positive with parasitological tests (8 only with APC positive, 1 only with DV positive, 4 APC positive/DV positive, 1 APC positive/PCR positive) and 5 were detected only with molecular methods. Three of the five patients with only a positive PCR in the stool were major discordances in serology (positive result with CrAg-ELISA and negative result with NIE-ELISA). In these three patients, isotypes IgG1 and IgG4 were negative.

Sensitivity and specificity calculated with the manufacturers' cut-off indexes for the two commercial tests are summarized in Table 4. Test accuracy for both techniques using primary and composite reference standards at different cut-off levels is

shown in Table S1. Optimal cut-off indexes for CrAg-ELISA were 3.55 and 1.00 using the primary and composite gold standard, respectively. Optimal cut-off indexes for NIE-ELISA were 2.10 and 0.76 using the primary and composite gold standard, respectively.

Predictive values for different prevalence levels are shown in Table S2. The ROC curves are shown in Figure S1.

Discussion

Imported tropical diseases are a growing global health problem in industrialized countries because of the increase in international travel as well as immigrants and refugees.²² In a tertiary care hospital with a predominantly immigrant population and with the increasing number of transplants, the use of corticosteroids and immune-modulating drugs and HIV infections, establishing protocols for the screening of tropical diseases is key to preventing and treating potential complications.²³ In this regard, *S. stercoralis* is one of the most important imported infections to diagnose and treat, especially in immunosuppressed patients in order to prevent fatal outcomes like hyperinfection syndrome and disseminated infection.²⁴ Diagnosing strongyloidiasis remains challenging, so it is still underdiagnosed both in endemic and non-endemic areas.²⁵ Its diagnosis is based on parasitological techniques and serological tests.²⁶ Detection of larvae in stool samples is confirmatory of the infection, but the irregular output of larvae and the low parasite load due to autoinfection cycles²⁵ decrease the detection rate with these techniques, especially in chronic infections.²⁷ Different strategies have been developed to improve the sensitivity of classic parasitological tests like repeated stool examinations,²⁸ concentration with formalin-ether or with other formalin-derived products,^{29,30} the Harada-Mori technique or APC.^{31,32} In the present study, only 19 patients were confirmed cases with detection of larvae or genetic material in stool samples. This may be influenced by reasons other than the low sensitivity of the parasitological tests. Parasitological diagnosis in stool samples is not always requested by the clinician (i.e., only serological tests were performed in some patients). *Strongyloides* screening should be considered in non-endemic countries such as Spain, especially for immunocompromised patients. This screening should be performed using a combination of serological and classical parasitological tests to achieve a more accurate diagnosis.

Table 3. Classification of results (only diagnostic samples) according to primary and composite gold standards (N=223)

Index tests results	Primary gold standard			Composite gold standard		
	True positive	True negative	Total	Infected	Not infected	Total
CrAg-ELISA						
Positive	18	13	31	74	15	89
Negative	1	34	35	9	125	134
Total	19	47	66	83	140	223
NIE-ELISA*						
Positive	15	7	22	60	9	69
Negative	4	40	44	23	131	154
Total	19	47	66	83	140	223

*Equivocal results were considered negative.

Table 4. Test accuracy at manufacturer's validated cut-off level and concordance level

	CrAg-ELISA (Primary gold standard)	CrAg-ELISA (Composite gold standard)	NIE-ELISA (Primary gold standard)	NIE-ELISA (Composite gold standard)
Sensitivity, % (95% CI)	94.7 (75.4 to 99.0)	89.2 (80.7 to 94.2)	78.9 (56.7 to 91.5)	72.3 (61.8 to 80.8)
Specificity, % (95% CI)	72.3 (58.2 to 83.1)	89.3 (83.1 to 93.4)	85.1 (72.3 to 92.6)	93.6 (88.2 to 96.6)
K index (95% CI)	0.565 (0.362 to 0.767)	0.773 (0.687 to 0.859)	0.612 (0.402 to 0.821)	0.682 (0.580 to 0.784)

One of the problems with serological diagnosis is the lack of specificity of the commercial tests. Cross-reactions with other parasites, including hookworm, *Schistosoma* spp.,³³ filarial infections^{12,13} and *Toxocara* spp.,³⁴ have been described. More specific antigens like NIE¹⁷ and *S. stercoralis* immunoreactive (Ssir)¹⁵ are recombinant antigens that can improve the specificity of the serological diagnosis. In this regard, the LIPS assay using a combination of NIE and Ssir antigens has a proven sensitivity and specificity of 100%,⁹ but it is not available in most laboratories due to the high cost, so its implementation in routine diagnosis in a non-reference laboratory has not yet occurred. Furthermore, ELISA-based tests are the most widespread techniques in routine serological diagnosis, thanks to their simplicity and the possibility of automation. A commercial NIE-ELISA has been recently released, thus only a study has evaluated its performance.³⁵ As for CrAg-ELISAs, both commercial and in-house tests have been widely used and evaluated, yielding sensitivities ranging from 83.3 to 90.8%.^{36,37} In the present study, commercial CrAg-ELISA sensitivities of 94.7 and 89.2% were obtained, depending on the gold standard, while the commercial NIE-ELISA yielded a sensitivity of <80% using both gold standards. These results are in agreement with other studies, where in-house NIE-ELISA showed sensitivities ranging from 70.8 to 84.0%.^{35,37,38}

Regarding specificity results, as expected the NIE-ELISA was more specific than the CrAg-ELISA (72.3% vs 85.1% using the

primary gold standard and 89.3% vs 93.6% using the composite gold standard). These results are slightly higher for NIE-ELISA than those previously reported in similar studies.^{35,37} Furthermore, the lower specificity for the CrAg-ELISA using the primary gold standard can be explained by the fact that few patients were confirmed cases with detection of larvae in the stool. This was expected because of the retrospective design of the study and the heterogeneity of the requested diagnostic tests, as explained above. As for concordance results between both commercial tests, moderate concordance was obtained between commercial CrAg-ELISAs and commercial NIE-ELISAs, as previously described by other authors evaluating commercial CrAg-ELISA and in-house NIE-ELISA.³⁷

In the absence of an accurate gold standard for *S. stercoralis* diagnosis and noting that each author defines a reference method, the different levels of sensitivity, specificity and concordance (between techniques and gold-standards) reported in the literature should be carefully interpreted.³⁹ In the present study, we calculate optimal cut-off points that differ from those proposed by the manufacturers, underscoring that maybe a different cut-off level for each group of patients (i.e., higher cut-off levels for low-risk patients, lower cut-off levels for immunosuppressed) should be defined since our study population includes immigrants, travellers, HIV patients and unexposed patients.

An interesting diagnostic algorithm could be to perform both serological tests sequentially (i.e., screening with CrAg-ELISA

I. Fradejas et al.

and confirmation of positive results with NIE-ELISA). However, in our experience, PCR as a second step for confirming positive results of CrAg-ELISA yields better results, as in three cases with detection of larval DNA in the stool, NIE-ELISA was negative. This also highlights the contribution of new diagnostic techniques like PCR to confirm the presence of the parasite in cases with only a positive serological test.²⁰ Further studies evaluating diagnostic algorithms for strongyloidiasis are needed.

In addition to this, isotype differentiation is another serological tool that could be helpful in the diagnosis of the parasite since it characterizes the immunological response of the host. Detection and differentiation of specific isotypes has proven to be useful in the diagnosis and follow-up of other parasitic infections such as hydatidosis,⁴⁰ but in the case of *S. stercoralis*, its complex biology due to its unique ability to cause autoinfection, may limit the application of these markers in screening or confirmation of the infection. In our case, isotypes were available in 32 discordant samples; of these, only 4 yielded a positive result for IgG1, which means that they were patients with chronic infections. Furthermore, three patients with a positive PCR of the stool yielded positive results with CrAg-ELISA, negative results with NIE-ELISA and negative results with IgG1 and IgG4, showing the great variability of these serological tests and highlighting the importance of combining serological and stool tests. Further investigations are needed in this field to better describe the immunological response and isotype profile of *S. stercoralis* infection.

The main limitation of the study is its retrospective design. As mentioned above, not all the patients had a requested parasitological test and few patients had a confirmed *S. stercoralis* diagnosis. To overcome this limitation, both techniques were evaluated using two different gold standards. This design was previously described by other authors³⁷ and provides a useful approach to calculate diagnostic accuracy with the lack of a gold standard. Another limitation is that although hookworm and *Schistosoma* spp. were not detected by faecal techniques in any of the patients, serological results for the diagnosis of these nematodes, or others such as *Toxocara* spp., were not analysed in the present study. Thus we were unable to fully evaluate the cross-reactivity problems mentioned above.^{33,41} This might be the subject of future studies.

Conclusions

In conclusion, the present study underlines the difficulties that microbiologists, parasitologists and clinicians face with a strongyloidiasis diagnosis. On the one hand, the crude antigen test is not extremely specific but shows good sensitivity and can be very useful in the screening of *S. stercoralis* in non-endemic areas. On the other hand, more specific recombinant antigen-based tests are promising but the commercial test evaluated in this study is not accurate enough for its intended use. The design of new and better serological techniques for use in routine clinical practice in non-endemic settings is needed.

Supplementary data

Supplementary data are available at Transactions online (<http://trstmh.oxfordjournals.org/>).

Authors' contributions: IF and APA conceived the study and designed the study protocol. IF and ERP carried out the parasitological and serological tests. JMHM and ML carried out the clinical assessment. IF, JMHM, ERP and APA performed the analysis and interpretation of the data. IF drafted the manuscript. ML, ERP, JMHM and APA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: We thank Ana-Maria Ruiz-Cueli and Maria Josefa Babiano for their technical support.

Funding: None.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario 12 de Octubre in Madrid, Spain approved this study. Written consent of patients was not required because patients' records were reviewed retrospectively.

References

- Schär F, Trostorf U, Giardina F, et al. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2288.
- Olsen A, van Lieshout L, Marti H, et al. Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(10):967–72.
- Ramírez-Olivencia G, Espinosa MÁC, Martín AB, et al. Imported strongyloidiasis in Spain. *Int J Infect Dis*. 2014;18:32–7.
- Buonfrate D, Baldissera M, Abrescia F, et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in northern Italy: results of a multicentre case-control study, February 2013 to July 2014. *Eurosurveillance*. 2016;21(31):30310.
- Galiano A, Trelis M, Moya-Herráiz A, et al. Donor-derived *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after simultaneous kidney/pancreas transplantation. *Int J Infect Dis*. 2016;51:19–21.
- Fardet L, Génereau T, Cabane J, et al. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(10):945–7.
- Inês EdJ, Souza JN, Santos RC, et al. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop*. 2011;120(3):206–10.
- Sato Y, Kobayashi J, Toma H, et al. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(3):248–50.
- Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, et al. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Infect Dis*. 2008;198(3):444–51.
- Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, et al. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(2):129–33.
- Gonçalves ALR, Nunes DS, Gonçalves-Pires MRF, et al. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012;139(7):956–61.
- Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, et al. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4- and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. *Parasite Immunol*. 2013;35(5–6):174–9.

Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

- 13 Bon B, Houze S, Talabani H, et al. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1716-9.
- 14 Turrientes M-C, Perez de Ayala A, Norman F, et al. Visceral larva migrans in immigrants from Latin America. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1263-5.
- 15 Rascoe LN, Price C, Shin SH, et al. Development of Ss-NIE-1 recombinant antigen based assays for immunodiagnosis of strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003694.
- 16 Pérez-Molina JA, Díaz-Menéndez M, Pérez-Ayala A, et al. [Treatment of diseases caused by parasites]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(1):44-59.
- 17 Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, et al. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;125(1-2):73-81.
- 18 Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sapelete MC, et al. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitol Res*. 2007;101(5):1209-14.
- 19 Martín-Rabadán P, Martínez-Ruiz R, Cuadros J, et al. [Clinical microbiology laboratory and imported parasitic diseases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(10):719-25.
- 20 Saugar JM, Merino FJ, Martín-Rabadán P, et al. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Trop*. 2015;142:20-5.
- 21 Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. [ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]. *Med Clin (Barc)*. 1995;104(17):661-70.
- 22 Pérez-Molina JA, López-Palín A, Treviño B, et al. 6-year review of +Redivi: a prospective registry of imported infectious diseases in Spain. *J Travel Med*. 2017;24(5). doi:10.1093/jtm/tax035.
- 23 Salas-Coronas J, Cabezas-Fernández MT, Vázquez-Villegas J, et al. Evaluation of eosinophilia in immigrants in southern Spain using tailored screening and treatment protocols: a prospective study. *Travel Med Infect Dis*. 2015;13(4):315-21.
- 24 Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(1):208-17.
- 25 Montes M, Sawhney C, Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(5):500-4.
- 26 Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis*. 2001;33(7):1040-7.
- 27 Polanco LC, Gutiérrez LA, Arias JC, et al. Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). *Rev Esp Salud Pública*. 2014;88(5):581-600.
- 28 Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, et al. Short report: increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(4):683-4.
- 29 Anamnat W, Intapan PM, Maleewong W. A modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of human strongyloidiasis. *Korean J Parasitol*. 2013;51(6):743-5.
- 30 Ahmadi NA, Damraj FA. A field evaluation of formalin-gasoline technique in the concentration of stool for detection of intestinal parasites. *Parasitol Res*. 2009;104(3):553-7.
- 31 Koga K, Kasuya S, Khambonruang C, et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(4):518-21.
- 32 Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, et al. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol*. 1990;76(3):425-8.
- 33 Ines E de J, Silva MLS, Souza JN, et al. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(1):31-5.
- 34 Turrientes MC, de Ayala AP, Norman F, et al. Visceral larva migrans in immigrants from Latin America. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1263-5.
- 35 Anderson NW, Klein DM, Dornink SM, et al. Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(5):732-6.
- 36 Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):438-42.
- 37 Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, et al. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2640.
- 38 Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, et al. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(10):1624-30.
- 39 Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, et al. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):543-52.
- 40 Mourglia-Ettlin G, Miles S, Hernandez A, et al. Antibody profiling in ultrasound normal individuals with positive serology for cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(2):93-100.
- 41 Sultana Y, Gilbert GL, Ahmed B-N, et al. Strongyloidiasis in a high risk community of Dhaka, Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(12):756-62.

Downloaded from https://academic.oup.com/txm/advance-article-abstract/doi/10.1093/txm/tyy010/5096880 by St Francis Xavier University user on 16 September 2018